

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

CD8⁺ TEMRA rakkude hindamine psoriaasi korral

Bakalaureusetöö

Geenitehnoloogia õppekava

12 EAP

Anella Salmistu

Juhendajad PhD, Liina Tserel
 PhD, Lili Azin Milani
 MSc, Ahto Salumets

TARTU 2019

CD8⁺ TEMRA rakkude hindamine psoriaasi korral

Psoriaas on põletikuline nahahaigus, mis on vahendatud T-rakkude poolt. Haigust iseloomustab immuunrakkude liikumine naha pindmistes kihtidesse ja keratinotsüütide kontrollimatu jagunemine. Psoriaasi puhul on täheldatud CD8⁺ TEMRA rakkude osakaalu suurenemist, mis on iseloomulik põletikulistele protsessidele ja vananemisele.

DNA metülatsoonimustri põhjal on võimalik eristada erinevaid rakutüüpe ning hinnata nende proportsioone veres. Antud bakalaureusetöös uuriti CD8⁺ TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste CpG lookuste metülatsooni tasemeid. Lisaks kontrolliti, kas Tartu Ülikooli molekulaarpatoloogia laboris teiste töögrupi liikmete poolt loodud CD8⁺ TEMRA rakkude arvu ennustamise mudeli põhjal on võimalik eristada psoriaasihaigeid ja terveid indiviide.

Märksõnad: Psoriaas, CD8⁺, TEMRA, metülatsoon

CERCS: B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

Evaluation of CD8⁺ TEMRA cells in psoriasis

Psoriasis is an inflammatory skin disease that is mediated by T cells. It is associated with changes in epidermal proliferation and immune cell influx into the skin. In addition, it is shown that CD8⁺ TEMRA T cells are also involved in pathogenesis of psoriasis. The proportion of CD8⁺ TEMRA cells increases during inflammatory processes and ageing.

Based on DNA methylation it is possible to differentiate cell populations and predict cell types proportions. In this study, changes in methylation profile of the most relevant CpG sites were evaluated for prediction of CD8⁺ TEMRA cells in psoriasis patients and controls. Moreover, the proportion of CD8⁺ TEMRA cells was quantified with a prediction model generated by the University of Tartu Molecular Pathology Research Group. Furthermore, corresponding immune cell percentage in psoriasis patients and controls were predicted using site-specific methylation data.

Keywords: Psoriasis, CD8⁺, TEMRA, methylation

CERCS: B500 Immunology, serology, transplantation

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. PSORIAAS	7
1.1.1. Epidemioloogia	7
1.1.2. Sümptomid, kliiniline pilt	7
1.1.3. Psoriaatilised muutused nahas	8
1.1.4. Psoriaasi erinevad vormid	9
1.1.5. Psoriaasi tekkemehhanismid	10
1.1.5.1. Geneetika ja haigust vallandavad faktorid	10
1.1.5.2. Immuunsüsteemi roll psoriaasi tekkes	11
1.2. DNA METÜLATSIOON	14
1.2.1. Geeniekspressiooni regulatsioon DNA metülatiooni abil	14
1.2.2. Naatriumbisulfit-töötlus	16
1.2.3. DNA metüleerimise kasutamine biomarkerina	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	18
2.1. TÖÖ EESMÄRGID	18
2.2. MATERJAL JA METOODIKA	18
2.2.1. Valim	18
2.2.2. Genoomse DNA eraldamine	19
2.2.3. Naatriumbisulfit-töötlus	19
2.2.4. Bisulfit-töödeldud DNA amplifitseerimine	20
2.2.4.1. Töös kasutatud praimerid	20
2.2.4.2. Polümeraasi ahelreaktsioon	21
2.2.4.3. Geel-elektroforees	22
2.2.5. Sekveneerimisraamatukogude ettevalmistamine	22
2.2.5.1. Amplikonide kokku tõstmine ja puhastamine	22

2.2.5.2.	DNA kontsentratsiooni mõõtmine HS Qubitiga.....	22
2.2.5.3.	Amplikonide segu lahjendamine ning märgistamine Nextera XT indeksitega.....	23
2.2.5.4.	Indeksitega märgistatud proovide puhastamine	23
2.2.5.5.	Indeksitega märgistatud proovide kontsentratsiooni ja fragmentide suuruse mõõtmine.....	24
2.2.5.6.	Proovide kvaliteedi kontroll ning sekveneerimine tuumiklaboris.....	25
2.2.6.	Andmeanalüüs	25
2.3.	TULEMUSED	26
2.3.1.	Valimi kirjeldus	26
2.3.2.	Geel-elektroforees.....	27
2.3.3.	Grupispetsiifilise DNA metülatsiooni hindamine	28
2.3.4.	Uuritud CpG lookuste metülatsiooniprofiilid.....	31
2.3.5.	CD8 ⁺ TEMRA rakkude arvu ennustamine varem loodud mudeliga psoriaasi korral	32
2.3.6.	CD8 ⁺ TEMRA rakkude väärtuste ennustamiseks kasutatud CpG lookused ..	34
2.4.	ARUTELU	36
	KOKKUVÕTE	39
	SUMMARY.....	40
	TÄNUSÕNAD.....	41
	KASUTATUD KIRJANDUS.....	42
	KASUTATUD VEEBIAADRESSID	48
	LISAD	49
	LIHTLITSENTS.....	54

KASUTATUD LÜHENDID

CD8 ⁺	diferentseerumise klaster, ingl. k <i>cluster of differentiation 8</i>
CCR7	C-C motiivi sisaldava kemokiini retseptor 7, ingl. k <i>C-C chemokine receptor type 7</i>
CpG	tsütosiin-guaniin dinukleotiid, ingl. k <i>cytosine-guanine dinucleotide</i>
IL	interleukiin, ingl. k <i>interleukin</i>
INF	interferoon, ingl. k <i>interferon</i>
PSORS	psoriaasi vastuvõtlikkus, ingl. k <i>psoriasis susceptibility</i>
RBC	punased vererakud, ingl. k <i>red blood cells</i>
SAM	S-adenosüülmetioniin, ingl. k <i>S-adenosylmethionin</i>
TAE	Tris-atsetaat-EDTA puhver, ingl. k <i>Tris-acetate-EDTA</i>
T _{CM}	tsentraalne mälu T-rakk, ingl. k <i>central memory T cell</i>
TE	Tris-EDTA puhver, ingl. k <i>Tris-EDTA</i>
T _{EM}	efektor-mälu T-rakk, ingl. k <i>effector memory T cell</i>
TEMRA	lõplikult diferentseerunud efektor-mälu T-rakud, ingl. k <i>terminally differentiated effector memory T cells</i> ,
Th	T-abistajarakk, ingl. k <i>T helper cells</i>
T _N	naiivne T-rakk, ingl. k <i>naive T cell</i>
TNF	tuumori nekroosi faktor, ingl. k <i>tumor necrosis factor</i>

SISSEJUHATUS

Psoriaas on põletikuline nahahaigus, mille esinemissagedus on suurim Põhja-Euroopa päritolu inimeste seas. Haiguse avaldumisel mängivad olulist rolli nii keskkond kui ka immuunsüsteem. Lisaks on psoriaasil täheldatud tugevat geneetilist tausta. Haiguse kujunemisel on kesksel kohal T-lümfotsüüdid ehk T-rakud (Gupta et al. 2014). T-abistajarakkude (*T helper cells*) toodetud tsütokiinid aktiveerivad teisi immuunrakke, mis soodustavad põletiku kestvust, ja indutseerivad keratinotsüütide jagunemist ning psoriaatiliste nahanaastude teket (Ho and Kupper 2019). Psoriaasi korral on täheldatud ka CD8⁺ TEMRA (lõplikult diferentseerunud efektor-mälu) T-rakkude osakaalu suurenemist, mis on iseloomulik põletikulistele protsessidele ja vananemisele (Šahmatova et al. 2017; Martin ja Badovinac 2018; Pereira ja Akbar 2016).

DNA metülatsioon on üks kõige enam uuritud epigeneetiline modifikatsioon. DNA metülatsioonimuster on rakkudes erinev tagades rakutüübispetsiifiliste geenide ekspressiooni. Seetõttu on DNA metüleeritus väga heaks biomarkeriks erinevate rakutüüpide eristamiseks ja ennustamiseks. CD8⁺ TEMRA rakkude arvu ennustamiseks töötati Tartu Ülikooli molekulaarpatoloogia laboris välja mudel, mis kombineerides CpG (tsütosiin-guaaniin) lookuste metülatsiooni väärtuseid erinevate immuunrakkude alampopulatsioonide voolutsütomeetria tulemustega, aitab ennustada CD8⁺ TEMRA rakkude osakaalu kõigi valgete vererakkude hulgast.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks on kirjeldada valitud CD8⁺ TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste CpG lookuste metülatsiooni tasemete väärtuseid psoriaasihaigetel patsientidel. Peamine eesmärk on kontrollida, kas molekulaarpatoloogia laboris teiste töögrupi liikmete poolt loodud TEMRA rakkude arvu ennustamise mudeli tulemuste põhjal on võimalik eristada psoriaasihaigeid ja terveid indiviide.

Töö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas bio- ja siirdemeditsiini instituudis molekulaarpatoloogia uurimisrühmas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. PSORIAAS

1.1.1. Epidemioloogia

Psoriaas on krooniline põletikuline nahahaigus, mille all kannatab umbes 2-3% kogu maailma rahvastikust (Hayes 2010). Haigus avaldub kõige sagedamini puberteedieas vanuses 16-22 eluaastat ning 50-ndates eluaastates (Henseler 1985). Mehed ja naised haigestuvad võrdse sagedusega. Psoriaas on levinud kõikjal maailmas. Kõige rohkem haigestunuid on jahedama kliimaga regioonides, vähem esineb seda troopilise kliimaga riikides. Psoriaasi haigestunute sagedus on kõige suurem Põhja-Euroopa päritolu inimeste seas, haigust esineb vähem Ida-Aasia ja Aafrika rahvaste seas. Näiteks indiaanlastel ei esine psoriaasi üldse (Gupta et al. 2014; Raychaudhuri ja Farber 2001). Eesti Psoriaasiliidu andmetel¹ on Eestis umbes 43000 psoriaasi-haiget moodustades umbes 3-4% elanikkonnast.

Tegu on väga kompleksse põletikulise haigusega, mille avaldumist mõjutavad nii geneetiline eelsoodumus, immuunsüsteem, elustiil kui ka erinevad keskkonnastiimulid, näiteks nahatrauma, infektsioon, stress, ravimid (Hawkes et al. 2017).

1.1.2. Sümptomid, kliiniline pilt

Psoriaas võib avalduda igas eluetapis. Kõigepealt ilmnevad ümbritsevast nahast veidi kõrgemad kuivad, selgelt piiritletud laigud (psoriaatilised nahanaastud), millele tekivad hõbedased ketendused. Neid iseloomustab ka punakas värvus haiguskolde kohas (Myers et al. 2006). Esmakordselt tekkinud lööve on tavaliselt väiksema läbimõõduga, kuid haigus-kolded võivad laieneda ja omavahel liituda. Sageli esineb psoriaatilistes lööbekohtades sügelus- ja/või põletustunnet (Sampogna et al. 2004). Psoriaatilised nahanaastud võivad tekkida kõikidele kehaosadele. Enam levinumad kohad on põlved, küünarnukid ja pea piirkond (Raychaudhuri ja Gross 2000).

Psoriaas ei mõjuta aga ainult nahka, vaid sellega kaasneb sageli ka teisi haigusi. Psoriaasihaigetel on täheldatud psühholoogiliste probleemide ning süsteemsete haiguste, näiteks metaboolse

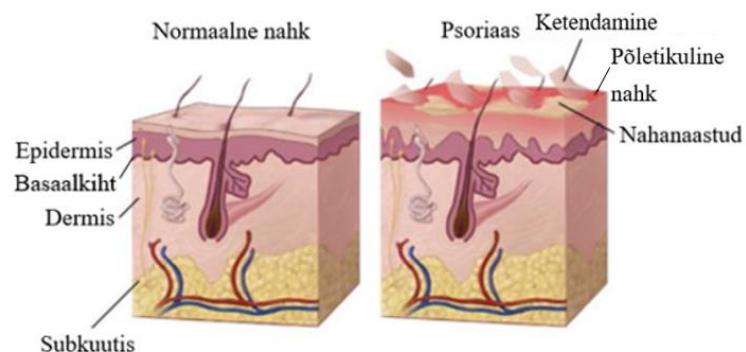
¹ <http://www.epsol.ee/print.php?doc=40&print=true>

sündroomi, ülekaalulisuse ja diabeedi, sagenemist (Augustin et al. 2010). Umbes 30%-l haigetel kujuneb välja ka põletikuline artriit (Raychaudhuri et al. 2014).

Psoriaasile ei ole seni leitud ühtset ravi, aga on erinevaid võimalusi, mis aitavad leevendada haiguse sümptomeid ja seda kontrolli all hoida (Boehncke ja Schön 2015). Samuti ei ole siiamaani kindlaks tehtud spetsiifilisi markereid, mille järgi saaks ennustada haiguse kulgu ja ravimite mõju (Villanova et al. 2013). Psoriaasi raskusastme mõõtmiseks on välja töötatud psoriaasi ulatuse ja ägeduse ehk PASI (*psoriasis area and severity*) skoor (Fredriksson ja Pettersson 1978), mis võtab arvesse kolme nahakahjustuste kliinilist parameetrit: ketendumist, punase värvuse intensiivsust ning psoriaasi-lööbe paksus (Boehncke and Schön 2015).

1.1.3. Psoriaatilised muutused nahas

Psoriaas on nahahaigus, mida iseloomustab krooniline põletik, leukotsüütide infiltreerumine naha pindmistes kihtidesse (dermisesse ja epidermisesse) ning epidermise rakkude ehk keratinotsüütide kontrollimatu jagunemine (Cai et al. 2012). Inimese nahk koosneb kolmest kihist: marrasnahk ehk epidermis, pärisnahk ehk dermis, alusnahk ehk subkuutis (Joonis 1). Epidermis on pidevalt uuenev kude, mille moodustavad keratiini sisaldavad rakud ehk keratinotsüüdid. Keratinotsüüdid uuenevad basaalkihilt, kus toimub naharakkude jagunemine (Ainsworth 2012). Naharakkude uuenemine toimub tavaliselt umbes 28-30 päeva jooksul (Schön ja Boehncke 2005).



Joonis 1. Normaalse naha ja psoriaatilise naha võrdlus. Imetajate nahas eristatakse kolme kihti: epidermist ehk marrasnahka, pärisnahka ehk dermist ning alusnahka ehk subkuutist. Psoriaasile on iseloomulik põletikuline nahk ja paksenenud epidermis, mis põhjustab haigusele omase fenotüübi – ketendavad psoriaatilised nahanaastud. Kohandatud joonis²

² <https://beckyb.com.au/2018/10/psoriasis-i-think-ive-got-it-but-im-not-sure/>

Psoriaasi korral toimub epidermise paksenemine, mille põhjustab rakkude jagunemise suurenemine naha basaalkihis (Wrone-Smith et al. 1997). Keratinotsüütide jagunemine on psoriaasi korral umbes 8 korda kiirem toimudes 3-5 päeva jooksul (Schön ja Boehncke 2005) ning nad on apoptoosi mineku suhtes resistentsemad. Täpne mehhanism, kuidas psoriaasi korral apoptoosi maha surutakse, pole veel täpselt teada, kuid usutakse, et see on seotud Bcl-2 valguperekonnaga, mis kontrollib apoptootilisi protsesse. Psoriaasile on iseloomulik just apoptoosi mahasuruvate Bcl-2 valkude suurenenud ekspressioon. Tänu sellele tekivad psoriaasile iseloomulikud nahanaastud (Wrone-Smith et al. 1997).

1.1.4. Psoriaasi erinevad vormid

Psoriaasil eristatakse morfoloogia alusel nelja erinevat vormi: naastulist (*plaque, vulgaris*), tilgakujulist (*guttate*), mädavillilist (*pustular*) ja erütrodermilist (*erythrodermic*) psoriaasi. Täpsem psoriaasi alamtüüp määratakse kindlaks nahalööve asukohta ja kuju järgi (Raychaudhuri et al. 2014). Joonisel 2 on välja toodud neli kõige olulisemat psoriaasi vormi ning nende põhilised esinemispiirkonnad.

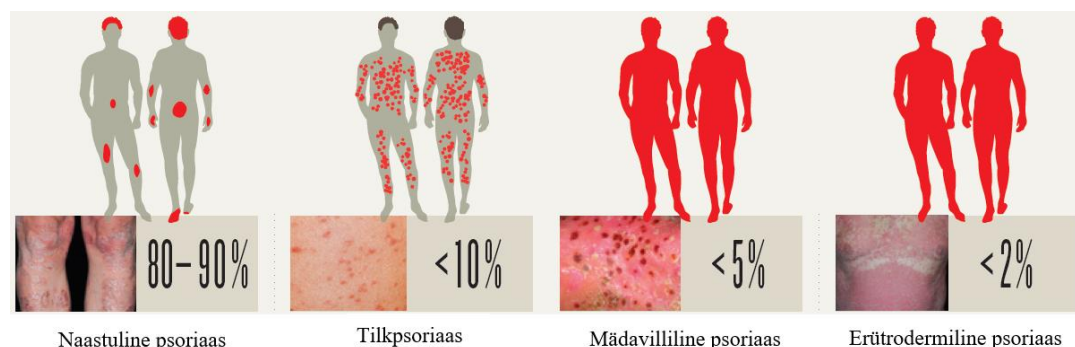
Kõige sagedasem psoriaasi vorm on naastuline psoriaas, mida esineb umbes 80-90% juhtudest. Selle korral esineb lööve sümmeetriliselt, peamiselt küünarnukkidel, põlvedel, peapiirkonnas. Naastulisele psoriaasile on iseloomulik selgepiirilised, ketendavad, punakad lööbed, mis läbimõõt on suurem kui 0,5 cm (Griffiths et al. 2007).

Esinemissageduselt järgmine on tilkpsoriaas ehk tilgakujuline psoriaas, mis avaldub kõige sagedamini lastel ja enne 30-ndat eluaastat (Chandra et al. 2015). Sellele on iseloomulikud väikesed 2-10 mm läbimõõduga veetilkakujulised psoriaatilised nahanaastud (Langley et al. 2005).

Mädavillilist psoriaasivormi esineb väga harva (Schön ja Boehncke 2005). Antud alatüüp sarnaneb naastulise psoriaasiga. Samas pole psoriaatilised nahakahjustused selgelt piiritletud ning nende peal esinevad villid (Murphy et al. 2007).

Kõige raskem haiguse vorm on erütrodermiline psoriaas, mille üheks põhjuseks on eelnevalt välja ravimata psoriaas (Raychaudhuri et al. 2014). Haiguse vorm haarab enda alla rohkem kui 90% kogu nahapinnast (Murphy et al. 2007) ja mõjutab tugevalt naha soojusregulatsiooni (Langley et

al. 2005). Ilma meditsiinilise sekkumiseta võib erütrodermiline psoriaas olla eluohtlik (Potter et al. 2017).



Joonis 2. Psoriaasi neli peamist vormi, nende esinemissagedused ja nahalööbe asukohad.

Naastulist psoriaasi (80-90% juhtudest) iseloomustavad punakad selgepiirilised nahalööbed, mis asetsevad sümmeetriliselt põlvedel, küünarnukkidel ja pea piirkonnas. Tilkspsoriaasile (alla 10%) on iseloomulikud väikesed punakad nahalööbed, mis asuvad peamiselt kere piirkonnas ja jäsemetel. Mädavillilisele vormile (alla 5%) on iseloomulik villide teke. Erütrodermiline vorm (alla 2%) haarab enda alla aga suurema osa nahapinnast. Kohandatud Crow (2012) järgi.

1.1.5. Psoriaasi tekkemehhanismid

1.1.5.1. Geneetika ja haigust vallandavad faktorid

Psoriaasi näol on tegu polügeneetilise haigusega, mida mõjutavad nii geneetika kui ka keskkonnategurid (Gupta et al. 2014). Täpne pärandumismuster ei ole teada (Schön ja Boehncke 2005), kuid haiguse avaldumise tõenäosus on suurem, kui keegi lähisugulastest põeb psoriaasi (Benoit 2007). 71% inimestest, kes haigestusid psoriaasi juba lapsepõlves, esineb perekonnas psoriaasihaigeid (Henseler 1985).

Haigust ei põhjusta ükski konkreetne geen või geenivariatsioon, aga on leitud geenilookuseid, mis on tihedalt seotud psoriaasi avaldumisega (Jiang et al. 2015). Neid nimetatakse psoriaasi vastuvõtlikkuse (*psoriasis susceptibility*, PSORS) lookusteks (Smith ja Barker 2006). Praeguseks on tehtud kindlaks 13 PSORS lookust, millel on oluline roll psoriaasi avaldumisel (Chandra et al. 2015). Kõige tugevamat seost psoriaasi ja geneetiliste markerite vahel nähakse kuuendas kromosoomis paikneva PSORS1 geeniregiooniga, mis on vastutav psoriaasi päriliku eelsoodumuse eest 35-50% juhtudest (Nair et al. 2000). Enamik psoriaasiga seotud lookuseid on seotud ka teiste

autoimmuun- ja põletikuliste haigustega, näiteks tüüp 1 diabeedi ja põletikulise soolehaigusega (*inflammatory bowel disease*) (Smith ja Barker 2006).

Peale geneetilise faktori mängivad psoriaasi avaldumises suurt rolli ka keskkonnategurid ja elustiil (Boehncke and Schön 2015). Haigustunnuste avaldumist soodustavad näiteks kuum ilm, päikesevalgus, kõrge stressitase ja ärevus (Farber 1974; Hayes 2010). Ka kerge trauma või päikesepeletus võivad panna aluse psoriaasi haigustunnuste avaldumisele. Enim mõjutab psoriaasi avaldumist kliima ja stress (Park and Youn 1998).

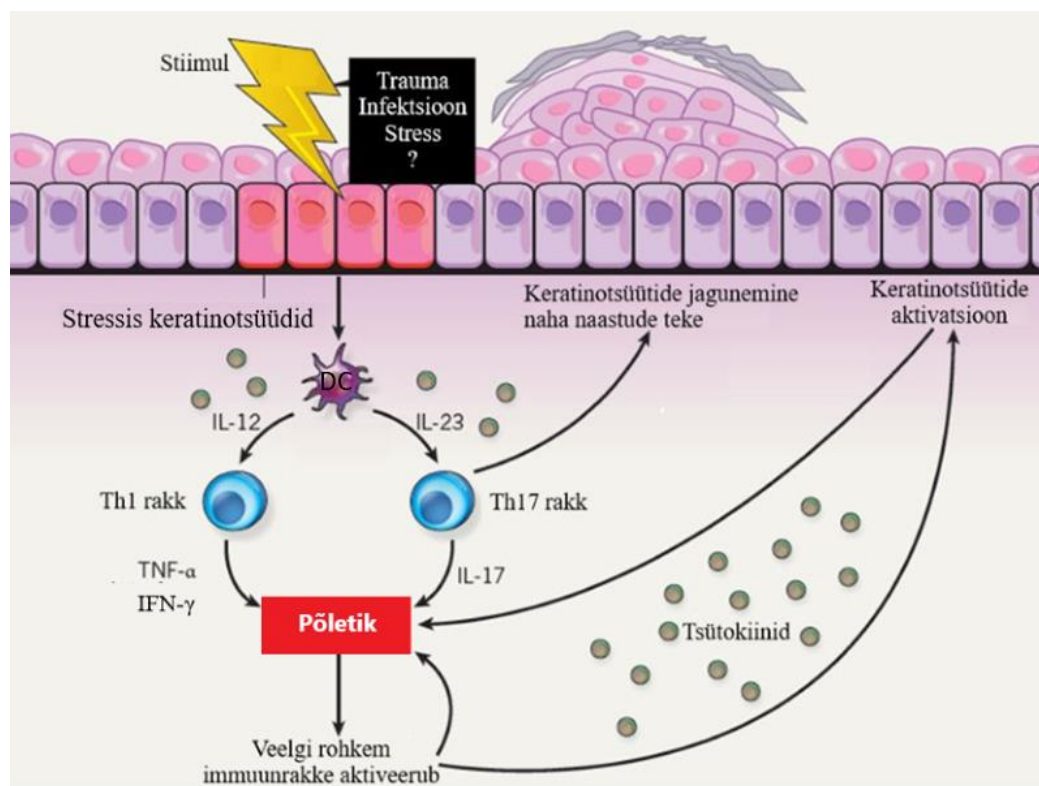
1.1.5.2. Immuunsüsteemi roll psoriaasi tekkes

Psoriaas on T-rakkude poolt vahendatud haigus, seega on immuunsüsteemil haiguse avaldumises väga oluline roll. Inimese immuunsüsteem on väga keeruline rakkude, organite ja kudede võrgustik, mis tagab vastupanu nii organismisiseste kui ka -väliste haigustekitajate suhtes (Marshall et al. 2018). Eristatakse kaasasündinud ja omandatud immuunsüsteemi. Evolutsiooniliselt kõige vanem immunoloogiline mehhanism on kaasasündinud immuunsüsteem, mis tagab kiireloomulise, kuid mitte nii spetsiifilise vastuse haigustekitajate suhtes. Kaasasündinud immuunsüsteemi moodustavad fagotsüüdid, dendriitrakud, nuumrakud, looduslikud tapja-T-rakud (*natural killer cells*). Tõhusama kaitse tagab adaptiivne ehk omandatud immuunsüsteem, mis kujuneb välja elu jooksul ning vastutab spetsiifilise immuunvastuse ja immunoloogilise mälu eest. Viimane on oluline kestvate ning korduvate infektsioonide korral (Heinaru 2012).

Psoriaasi kujunemisel mängivad tähtsat rolli mitmed erinevad rakutüübid, kuid kõige olulisemad on keratinotsüüdid ja T-rakud (Lowes et al. 2007). Haigust iseloomustab kaskaadne põletikuline protsess, mille algatuseks on vaja spetsiifilist stiimulit, mis tuntakse ära dendriitrakkude poolt. Selleks stiimuliks võivad olla ravimid, stress, infektsioon, nahatrauma, mille tulemusel dendriitrakud aktiveeruvad ning migreeruvad dermise lümfisõlmedesse, kus nad aktiveerivad naiivseid T-rakke (Griffiths 2007). Aktiveeritud dendriitrakud sekreteerivad interleukiin-12 (IL-12) ja interleukiin-23 (IL-23) tsütokiine (Ho ja Kupper 2019), mis põhjustavad dermises paiknevate T-abistajarakkude (*T helper cells*, Th) diferentseerumise vastavalt T-abistajarakkudeks 1 (Th1) ja T-abistajarakkudeks 17 (Th17) (Joonis 2) (Duvall et al. 2011).

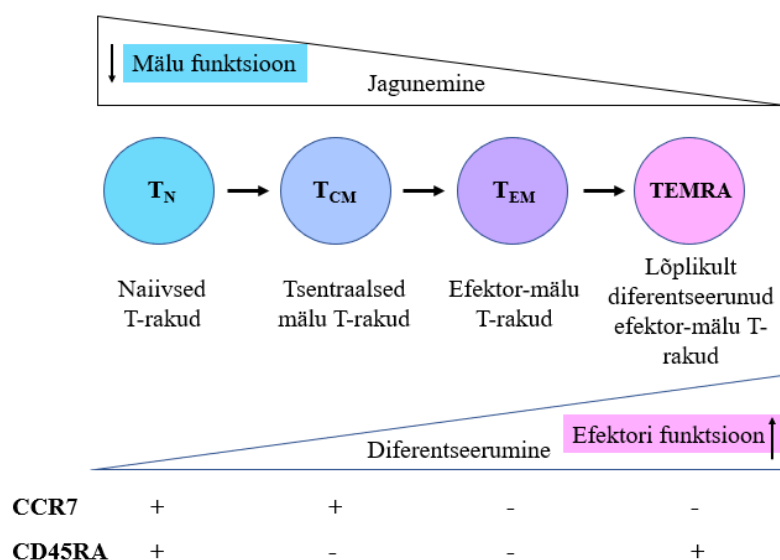
Th17 rakud sekreteerivad interleukiin-17 (IL-17) tsütokiine, mis on iseloomulikud just põletikulistele protsessidel ja indutseerivad keratinotsüütide põletikulise vastuse (Girolomoni et al.

2012). See soodustab epidermaalsete rakkude jagunemist, psoriaatiliste naastude teket ja immuunrakkude juurdevoolu põletiku tekke kohta (Hawkes et al. 2017). Ka Th1 poolt toodetavad interferoon-gamma (IFN- γ) ja tuumori nekroosi faktor-alfa (TNF- α) annavad keratinotsüütidele signaali jagunemiseks ning aitavad kaasa T-rakkude aktiveerumisele ja T-rakkude infiltratsioonile (Veale 2005). T-rakkude juurdevooluga suureneb sekreteeritavate tsütokiinide hulk, mis omakorda soodustavad põletiku kestvust (Baliwag et al. 2015). Tekib kaskaadne positiivse tagasiside ring, kus erinevate tsütokiinide sekretsiooniga aktiveeritakse üha rohkem T-rakke, mis aitavad kroonilist põletikku hoida (Prinz 2003). Kuna immuunrakud pole paiksed, vaid liiguvad organismis pidevalt ringi kasutades selleks vereringet, siis saabki põletik levida üle terve keha (Valdimarsson et al. 2009).



Joonis 2. Psoriaasile omase nahalööbe tekke immunoloogiline taust. Haigustunnuste avaldumiseks on vaja stiimulit, mis püütakse kinni dendriitrakkude (*dendritic cells*, DC) poolt, mis omakorda aktiveerivad T-rakke. Tsütokiinid IL-12 ja IL-23 indutseerivad vastavalt Th1 ja Th17 rakkude diferentseerumise, mis omakorda toodavad tsütokiine TNF- α , IFN- γ ja IL-17. Tsütokiinide sekretsioon aktiveerib veelgi rohkem immuunrakke, mis põhjustab tsütokiinide tootmise suurenemist ja keratinotsüütide aktivatsiooni. Th17 rakud indutseerivad keratinotsüütide jagunemist ja psoriaasile iseloomulike naha naastude teket. Kohandatud Ainsworth (2012) järgi.

Erinevates põletikulistes protsessides on väga olulised tsütotoksilised T-rakud (*cytotoxic T cells*) ehk CD8⁺ (*cluster of differentiation 8*) T-rakud (Pereira and Akbar 2016), mis jagatakse kahe pinnaretseptori CCR7 (kemokiini retseptor 7) ja CD45RA ekspresseerimise järgi neljaks (Joonis 3): naiivsed (*naive T cells*, T_N), tsentraalsed mälu (*central memory*, T_{CM}), efektor-mälu (*effector memory*, T_{EM}), lõplikult diferentseerunud efektor-mälu (*terminally differentiated effector memory*, TEMRA) T-rakkudeks (Larbi and Fulop 2014). CCR7 on omane sekundaarsetes lümfoïdorganites (põrn, lümfisõlmed, limaskestade lümfoïdne kude) paiknevatel T_N ja T_{CM} rakkudel (Sallusto et al. 1999).



Joonis 3. CD8⁺ T-rakkude alapopulatsioonid ja diferentseerumine. Kahe pinnaretseptori CCR7 ja CD45RA ekspresseerimise alusel jagatakse CD8⁺ T-rakud järgmisteks alapopulatsioonideks: naiivsed (T_N), tsentraalsed (T_{CM}); efektor-mälu (T_{EM}); lõplikult diferentseerunud efektor-mälu (TEMRA) T-rakud. Diferentseerumisega raku potents ehk võime areneda erinevateks raku-tüüpideks ja mälu funktsioon väheneb, samas kui efektorfunktsioon suureneb. Kohandatud Golubovskaya ja Wu (2016) järgi.

Stiimuli olemasolul diferentseeruvad naiivsed CD45RA retseptorit ekspresseerivad T-rakud kõige pealt T_{CM} rakkudeks ning siis T_{EM} rakkudeks. Mõlemad mälu rakkude alapopulatsioonid võivad püsida organismis umbes 10 aastat (Khairutdinov et al. 2017). T_{CM} rakkudel puudub põletikuline ja tsütotoksiline aktiivsus, kuid T_{EM} rakud on võimelised kiiresti realiseerima oma efektorfunktsioone (Sallusto et al. 1999). Efektorfunktsioon aitab ära tunda tsütotoksilisi võõrakehi ning reguleerida immuunvastust. Kõige suurema efektorfunktsiooniga on TEMRA rakud. Ca 95%

efektorrakkudest läheb apoptoosi, väike osa jääb mälurakkudeks, et teistkordsel kokkupuutel antigeeniga käivitaks immuunvastus kiiremini (Youngblood et al. 2017).

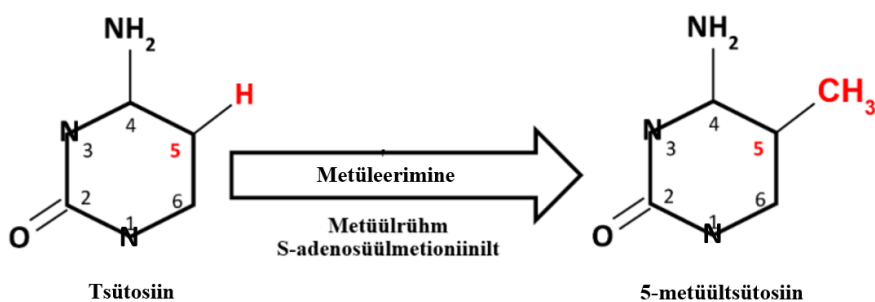
Kõige enam diferentseerunud on tsirkuleerivad TEMRA rakud. Neile on omane kõrge tsütotoksiline aktiivsus ja CD28 kostimulaatorse pinnaretseptori puudumine, mille kaudu toimuks T-rakkude aktivatsioon ja jagunemine (Hamann et al. 1997; Verma et al. 2017). TEMRA rakke iseloomustab ka CCR7 retseptori puudumine, kuid CD45RA retseptori re-ekspresseerumine (Larbi and Fulop 2014). TEMRA rakkude osakaal suureneb vananedes ja põletikulistes protsessides, seal hulgas psoriaasi korral (Šahmatova et al. 2017; Martin ja Badovinac 2018; Pereira ja Akbar 2016).

1.2. DNA METÜLATSIOON

1.2.1. Geeniekspressiooni regulatsioon DNA metülatiooni abil

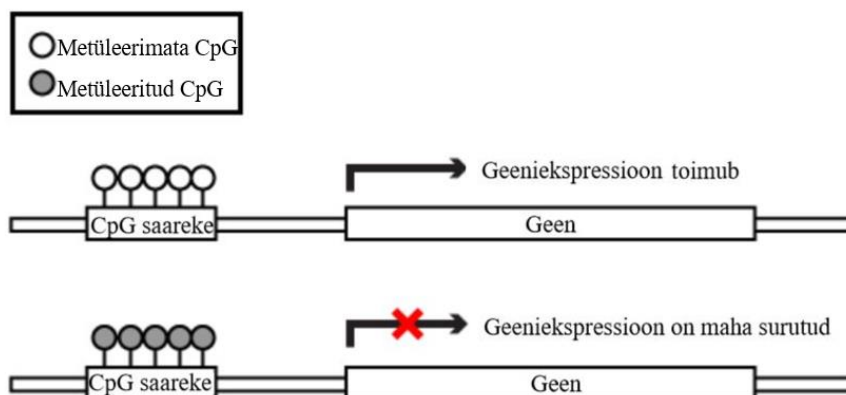
DNA metülatsoon on üks paremini uuritud epigeneetilisi markereid (Rakyan et al. 2011), millel on oluline roll geeniekspressiooni regulatsioonis. Tegu on päriliku epigeneetilise modifikatsiooniga, mis ei muuda DNA järjestust. DNA metüleerimine esineb tsütosiini (C) nukleotiidides, millele järgneb guaniin (G) (Lu 2013). Sellest tuleneb ka nimetus CpG lookus (*cytosine-guanine dinucleotide*), kus C ja G vahele jääb fosfodiesteride, mida tähistatakse p-tähega (Heinaru 2012).

DNA metüleerimist viivad läbi DNA metüültransferaasid, mis kannavad metüülrühma ($-\text{CH}_3$) doonorilt, S-adenosüülmetsioniinilt (*S-adenosylmethionin*, SAM) CH_3 -rühma tsütosiini viiendas positsioonis paiknevale süsinikule. Moodustub 5-metüültsütosiin (Johnson et al. 2012), mida on võimalik näha Joonis 4.



Joonis 4. DNA metüleerimise skeem. Tsütosiini viiendasse positsioonis asuvale süsinikule lisatakse metüülrühm ($-\text{CH}_3$), mille tulemusena tekib 5-metüültsütosiin. CH_3 -rühma doonor on S-adenosüülmetsioniin (SAM). Kohandatud Alokail ja Alenad (2015) järgi.

Inimese genoomis on umbes 28 miljonit CpG lookust, millest 80-90% on metüleeritud. CpG lookused paikneva hajusalt üle terve genoomi. Lühemaid CpG rikkaid regioone nimetatakse CpG saarekeseks (*CpG islands*) ning nad asuvad sageli geenide promootorala regioonis reguleerides geeniekspressiooni. 60% geenipromootoritest sisaldavad CpG saarekesi (Deaton et al. 2011). Joonis 5 on näha, kuidas CpG saarekese metüleerimine mõjutab geeni avaldumist. CpG lookuste metülatsiooni promootorpiirkonnas seostatakse geeni vaigistamise ehk vähenenud geeniekspressiooniga, kuna metüleeritud CpG saarekesed takistavad ekspressiooni indutseerivate transkriptsioonifaktorite juurdepääsu. Kui CpG lookused pole metüleeritud, initsieeritakse geeniekspressioon (Nasu et al. 2011). Näiteks koduhoidja (*housekeeping*) geenides on CpG saarekesed üldjuhul metüleerimata, sest nende geenideprodukte on rakkudel pidevalt vaja. Korduvjärjestuste promootoralades leidub aga palju metüleeritud CpG lookuseid (Dor ja Cedar 2018), mis ei lase transkriptsioonifaktoritel seonduda ega geenil ekspresseeruda (Johnson et al. 2012).



Joonis 5. CpG saarekese metüleerimine promootorpiirkonnas mõjutab geeniekspressiooni. Kui promootoralade piirkonnas leidub metüleeritud CpG lookuseid, siis see takistab ekspressiooni ning geen vaigistatakse. Metüleeritud CpG lookuste puudumisel pole geeni avaldumine blokeeritud. Kohandatud joonis³

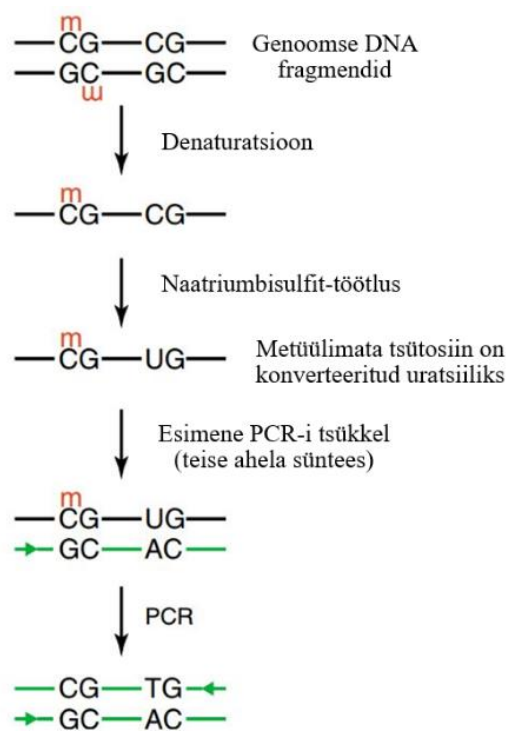
Kõikidel keharakkudel on sama nukleotiidne järjestus, aga reaalsuses on igal rakutüübil oma kuju, funktsioon ja talitus, mis tuleneb kindlate geenide avaldumisest. Oluline osa geeniekspressiooni reguleerimises on DNA CpG lookuste metüleerimisel (Dor ja Cedar 2018). Genoomi DNA

³ http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes_and_genomes/methylation.html

metüleerimismuster on väga dünaamiline ja muutub vanusega (Ciccarone et al. 2018), seda mõjutavad erinevad keskkonnategurid, haigused ja elustiil (Jung ja Pfeifer 2015). Samas on haiguste puhul raske määrata, kas muutunud metülatsioonimustri profiil on tekkinud haiguse tagajärjel või põhjustab seda haigust (Rakyan et al. 2011).

1.2.2. Naatriumbisulfit-töötlus

Üks kõige sagedamini kasutatavaid meetodeid DNA metülatsioonimustri uurimiseks on naatriumbisulfit-töötlus, mille käigus konverteeritakse metüleerimata tsütosiin (C) uratsiiliks (U), kuid metüleeritud tsütosiin (mC) jääb tsütosiiniks (Joonis 6).



Joonis 6. Naatriumbisulfit-töötluse põhimõte. DNA denatureeritakse ja töödeldakse naatriumbisulfitiga. Selle tulemusena konverteeritakse metüleerimata tsütosiinid (C) uratsiiliks (U). Peale PCR-i on uratsiilid nähtavad tümiinidena (T), metüleeritud tsütosiinid (mC) jäävad tsütosiinideks. Kohandatud Zilberman ja Henikoff (2007) järgi.

Pärast amplifikatsiooni on võimalik lookusspetsiifilist metülatsiooni taset hinnata näiteks PCR-i abil. PCR-i käigus muudetakse uratsiilid tümiinideks, metüleeritud tsütosiin jääb tsütosiiniks. Tulemuseks on modifitseeritud DNA, kus metüleeritud ja metüleerimata CpG lookuseid on

võimalik omavahel eristada. Bisulfit sekveneerimine on selleks üks kõige laialdasemalt kasutuses olevaid meetodeid.

1.2.3. DNA metüleerimise kasutamine biomarkerina

Üks kõige laialdasemalt uuritud epigeneetilisi modifikatsioone on DNA metülatsioon. Kuna DNA on väga stabiilne bioloogiline molekul, siis saab DNA metüleerimist kasutada biomarkerina.

Meditiinis on võimalik DNA metülatsioonimustri muutust kasutada haiguslike seisundite, näiteks vähkkasvaja diagnoosimiseks, kuna on täheldatud, et lisaks geneetilistele mutatsioonidele esineb ka epigeneetilisi muutusi vähkkasvaja tekkel ja arengul. Selleks uuritakse kindlate geenide metülatsioonitaseme muutuseid, mis on vähitüübi avaldumisega seotud (Mikeska and Craig 2014; Jin and Liu 2018). DNA metülatsiooniprofiili muutuseid on täheldatud ka näiteks neurogeneratiivsete ja autoimmuunhaiguste korral (Heyn and Esteller 2012).

DNA metülatsiooni üks kõige huvitavamaid ja tuntumaid rakendusi biomarkerina on nii-nimetatud epigeneetiline kell, mis ennustab indiviidi epigeneetilist vanust võttes arvesse kindlate CpG lookuste metüleerituse taset rakkudest, kudetest või organitest, mis on seotud vanusega. Nendel indiviididel, kelle ennustatud epigeneetiline vanus on suurem, kui kronoloogiline vanus, toimuvad epigeneetilised muutused kiiremini. Sellest võib järeldada, et antud inimese koed vananevad kiiremini (Horvath and Raj 2018).

Nagu juba varem mainitud on erinevates rakutüüpides erinev DNA metülatsioonimuster. Kuigi igas keharakus on sama genoomne DNA järjestus, siis rakutübile omased tunnused ja funktsioonid sõltuvad epigeneetilistest modifikatsioonidest, peamiselt DNA metülatsioonimustrist. CpG lookuste erinev metülatsioon tagab rakuspetsiifiliste geenide ekspressiooni (Futscher et al. 2002) ning selle alusel on võimalik ennustada rakutüüpide proportsioone veres (Kaushal et al. 2017). DNA metüleerituse erinevusel põhjal on proovitud välja töötada mudeleid, millega oleks võimalik ennustada erinevate rakutüüpide proportsioone veres. DNA metülatsioonil põhinevatel rakutüüpide ennustamise mudelitel on palju potentsiaali erinevate haiguste uurimisel ning esialgu on keskendutud peamiselt leukotsüütide ennustamisele (Houseman et al. 2012).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkideks oli:

- 1) Kirjeldada valitud CD8⁺ TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste lookuste metülatiooni tasemete väärtuseid psoriaasihaigetes patsientides ja tervetes.
- 2) Kontrollida, kas Tartu Ülikooli molekulaarpatoloogia laboris teiste töögrupi liikmete poole loodud CD8⁺ TEMRA rakkude arvu ennustamise mudel töötab psoriaasi tingimustes.

2.2. MATERJAL JA METOODIKA

2.2.1. Valim

Käesolevasse uuringusse kaasati Tartu Ülikooli Kliinikumi Nahahaiguste kliiniku 40 vabatahtlikku patsienti. Kõiki doonoreid informeeriti eelnevalt antud uurimistöö sisust ning nad kinnitasid oma nõusolekut uuringus osalemiseks allkirjastades informeeritud nõusoleku lehe. Valim koosnes 21-st psoriaasi diagnoosiga ja 19-st tervest isikust. Täpsemad andmed on esitatud Tabel 1. Haigete grupis oli 10 meest ning 11 naist, kelle keskmine vanus oli 52 eluaastat. Psoriaasihaigetest 18-l esines naastulise psoriaasi vorm, kahel tilkpsoriaas ning ühel inimesel muu psoriaasi vorm. Psoriaasihaigetel oli palju kaasuvaid haiguseid, kõige sagedamini esines südamehaiguseid. Kontrollgrupis olevad patsiendid pöördusid Nahahaiguste kliinikusse seoses teiste probleemidega, näiteks erinevate seenhaiguste, küünte haiguste või veenilaiendite tõttu. Tervete patsientide keskmine vanus oli 45 eluaastat ning gruppi kuulusid 11 meest ja 8 naist.

Tabel 1. Katses uuritud indiviidid

	Haiged	Terved
Proovide arv	21	19
Vanus aastates	17-85	23-85
Keskmine vanus aastates	52	45
Mehed	10	11
Naised	11	8

2.2.2. Genoomse DNA eraldamine

Genoomne DNA eraldati 2 ml EDTA vaakumkatsutisse (BD Vacutainer, USA) kogutud täisverest. Selleks lisati 2 ml verele 3 ml punaste vererakkude lüüsipuhvrit (RBC; 155mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 , 1mM EDTA- Na_2 pH 8). Saadud segu raputati intensiivselt ning inkubeeriti 10 minutit jääl. Seejärel tsentrifuugiti 10 minutit 600 rcf juures toatemperatuuril (Eppendorf 5810 R, A-4-62 rootor, Saksamaa) ning eemaldati supernatant jättes katsuti põhja umbes 5-10 mm lahust. Rakusade lahustati ülesse 2,5 ml RBC lüüsilahuses ning toatemperatuuril 10 minutit 500 rcf juures (Eppendorf 5810 R, A-4-62 rootor, Saksamaa). Peale supernatandi eemaldamist suspendeeriti rakud üles 200 μl RBC lüüsilahuses ning seejärel lisati 2 ml valgete vererakkude lüüsilahust (10mM Tris-HCl pH 8, 25mM EDTA- Na_2 pH 8, 2% SDS). Saadud lahus homogeniseeriti vorteksil, inkubeeriti üleöö toatemperatuuril ning seejärel inkubeeriti 3 tundi $+37^\circ\text{C}$ juures. Lüüsitud proovid asetati jahutamiseks 15 minutiks jääle, mille järel lisati 850 μl 10M ammooniumatsetaati (Naxo, Eesti), et sadestada välja valk-membraankompleksid. Proove inkubeeriti 10 minutit jääl, et kiirendada sademe moodustumist ning tsentrifuugiti 10 minutit 2400 rcf juures toatemperatuuril (Rotina 380 R, Hettich rootor 1798, Saksamaa).

Peale tsentrifuugimist lasti saadud supernatant läbi 70 μm rakufiltri, et eemaldada lüüsimata jäänud rakud ning lisati 2 ml isopropanooli (Naxo, Eesti). Genoomset DNA-d sisaldavaid katsuteid segati ettevaatlikult 5 minutit ning jälgiti DNA niitude väljasadestumist. Moodustunud sade viidi üle uude katsutisse ning pesti 2 ml 70% etanooliga (Honeywell Riedel-de Haën, Saksamaa) 5 minutit. Seejärel tõsteti sade tühja 1,5 ml katsutisse ning kuivatati toatemperatuuril 15 minutit, et etanooli jäägid saaksid aurustuda. Kuivatatud genoomse DNA sademele lisati 100 μl 1X TE puhvrit (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA- Na_2 pH 8) ning inkubeeriti 30 minutit $+56^\circ\text{C}$ juures. Seejärel asetati katsutid üleöö toatemperatuuril aeglasele loksutile, et DNA sade saaks täielikult lahustuda. DNA-proovide kvaliteeti hinnati NanoDrop 2000 spektrofotomeetril (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.2.3. Naatriumbisulfit-töötlus

Naatriumbisulfit-töötlus viidi läbi kasutades EZ DNA Methylation kitti (Zymo Research, USA) vastavalt tootja protokollile. Bisulfit-töötleses kasutati 600ng punktis 2.2.2 eraldatud genoomset DNA-d. Proove inkubeeriti üleöö termotsükleris Mastercycler (Eppendorf, Saksamaa). Selleks kasutati tootja poolt välja pakutud alternatiivset inkubeerimisrežiimi:

Kokku 16 tsükli

Denaturatsioon	95°C	30 sek
Konversioon	50°C	60 min
Temperatuuri hoidmine	4°C	∞

Proovid elueeriti 50 µl *M-Elution* puhvris. Edasisteks eksperimentideks hoiustati bisulfit-töödeldud DNA proove -20°C külmkapis.

2.2.4. Bisulfit-töödeldud DNA amplifitseerimine

2.2.4.1. Töös kasutatud praimerid

Käesolevas bakalaureusetöös genoomse DNA metülatsoonianalüüsis uuritavad CpG lookused on välja valitud Tartu Ülikooli molekulaarpatoloogia uurimisrühmas läbi viidud uurimistööde (Tserel et al. 2015) ning teiste uurimisrühmade varasemalt avaldatud teadusartiklitest. Töös kasutatud praimerid on varasemalt valmis tehtud teiste molekulaarpatoloogia uurimisrühma liikmete poolt. Kõikide praimerite nukleotiidsed järjestused on välja toodud Lisa 1.

UCSC Genome Browser⁴ andmebaasist saadi uuritavate CpG lookuste positsioonidest 200 nukleotiidi (nt) ülesvoolu ja allavoolu järjestused. Bisulfit-töödeldud DNA amplifitseerimiseks disainiti internetipõhise programmi Primer3⁵ abil praimerid järgmiste tingimustega:

- praimerite optimaalne pikkus 18-27 nt
- praimerite sulamistemperatuur (*melting temperature*, T_m) vahemikus 54-62°C
- PCR produkti (amplikoni) suurus vahemikus 80-150 nt
- GC protsent 20-60%
- praimerjärjestus ise ei tohtinud sisaldada CpG dinukleotiide

Kui Primer3 ei andnud antud parameetritega sobivaid praimerid kandidaate, disainiti käsitsi kasutades T_m ja GC% arvutamiseks internetipõhiseid programme⁶, et saada soovitud praimerid.

⁴ <https://genome.ucsc.edu/>

⁵ <http://primer3.ut.ee/>

⁶ <https://tmcaculator.neb.com/#!/main>

Disainitud praimeritele lisati Illumina üleulatuivad adapterjärjestused. Kodeeriva ahela 5'otsa lisati TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG järjestus ning mittekodeeriva ahela 5'otsa GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG järjestuse. Praimerid telliti firmast Metabion.

2.2.4.2. Polümeraasi ahelreaktsioon

Polümeraasi ahelreaktsioonis (PCR) kasutati 23 praimerit, mis on ära toodud lisas 1. PCR-i reaktsioon viidi läbi 20 µl mahus, iga reaktsiooni komponendid on ära toodud Tabel 2. PCR-i reaktsioonide kokkusegamiseks kasutati QIAgility (Qiagen, Saksamaa) robotit.

Tabel 2. PCR-il kasutatud reagentid ja nende lõppkontsentratsioonid

Reagent	Lõppkontsentratsioon
milliQ vesi	N/A
10X Yellow Buffer (Naxo, Eesti)	1x
25 mM MgCl ₂ (Solis BioDyne, Eesti)	1,5 mM
2 mM dNTP segu (Solis BioDyne, Eesti)	0,12 mM
5 U/µl HOT FIREPol DNA polümeraas (Solis BioDyne, Eesti)	0,06 U
12 ng/µl bisulfit-töödeldud DNA	0,72 ng/µl
0,5 µM F+R praimerite segu	0,2 µM

PCR viidi läbi masinaga Mastercycler gradient (Eppendorf, Saksamaa) vastavalt järgmistele tingimustele:

Eeldenaturatsioon	95°C	15 min	
Denaturatsioon	95°C	20 sek	} 40 tsüklit
Praimerite seostumine	56°C	30 sek	
Elongatsioon	72°C	1 min	
Lõplik elongatsioon	72°C	3 min	
Temperatuuri hoidmine	4°C	∞	

2.2.4.3. Geel-elektroforees

PCRi kontrolliks teostati agarosgeelelektroforees, kus kasutati 3%-list TAE (Tris-atsetaat-EDTA; Naxo, Eesti) agarosgeeli, millele lisati peale keetmist vajalik kogus etiidiumbromiidi (0,5 µg/ml; Naxo, Eesti). Pikkusmarkerina kasutati pUC19 DNA/MspI (HpaII) markerit (Thermo Fisher Scientific, USA). Elektroforeesi jaoks kasutati 1x TAE puhvrit ning firma Bio-Rad (USA) foreesivanni. Uuritavate amplikonide pikkused on välja toodud ILisa 1.

2.2.5. Sekveneerimisraamatukogude ettevalmistamine

2.2.5.1. Amplikonide kokku tõstmine ja puhastamine

Iga indiviidi amplikonid tõsteti kokku võrdses mahus, saades 40 erinevat amplikonide segu. Saadud amplikonide segu puhastamiseks kasutati Agencourt AMPure XP magnetkerakesi (Beckman Coulter, USA) tootja protokoll järgi.

AmpXP kerakestega puhastamine viidi läbi Gunster Biotech PCR 0,2 ml PCR 8-strip tuubides 8 proovi kaupa. Puhastamisse võeti 25 µl amplikonide segu. Puhastatud proovid elueeriti 17,5 µl Tris puhvris (Naxo, Eesti) millest võeti kasutusele 15 µl, et vältida magnetkerade ülekannet järgmisesse reaktsiooni.

2.2.5.2. DNA kontsentratsiooni mõõtmine HS Qubitiga

Puhastatud amplikonide segu kontsentratsioonid mõõdeti Qubit 2.0 fluoromeetriga (Thermo Fisher Scientific, USA) kasutades Qubit dsDNA HS Assay reagente ja Qubit Assay katsuteid (Thermo Fisher Scientific, USA) vastavalt tootja protokollile.

Kõikide proovide mõõtmiseks valmistati ette 10 ml Qubiti töölahust (*Qubit working solution*), mis koosnes 9950 µl Qubiti dsDNA puhvrist (*Qubit dsDNA Buffer*) ja 50 µl Qubiti reagendist (*Qubit reagent*).

Amplikonide segu kontsentratsioonide mõõtmiseks kasutati 2 µl punktis 2.2.5.1 valmistatud puhastatud segu. Proovide mõõtmistulemused saadi ühikutes ng/ml. Proovide kontsentratsioonide teada saamiseks kasutati järgmist valemit:

$$c = QF \text{ value} \bullet \frac{200}{x}$$

kus c on proovi kontsentratsioon; QF value on kontsentratsiooni väärtus, mille andis Qubit 2.0 fluoromeeter; x on number mikrolitrites, kui palju lisati dsDNA proovi Qubiti töölahusesse.

2.2.5.3. Amplikonide segu lahjendamine ning märgistamine Nextera XT indeksitega

Qubit 2.0 fluoromeetri mõõtmistulemuste põhjal valmistati proovide lahjendused kontsentratsiooniga 10 ng/μl. Disainitud praimeritele oli juba praimerite disaini käigus lisatud Illumina üleulatuva adapterjärjestused. See võimaldas puhastatud amplikonide otstesse lisada Nextera XT Index Kit v2 indeksjärjestused (Illumina, USA), mille abil eristatakse peale sekveneerimist erinevaid proove omavahel.

PCR viidi läbi 30 μl reaktsioonisegus. Reaktsiooni komponendid on ära toodud Tabel 3.

Tabel 3. Indeksite lisamise PCR-i reaktsioonisegu komponendid

Reagent	Kogus
Amplikonide segu (10 ng/μl)	5 μl
Nextera XT indeks 1 Primer	5 μl
Nextera XT indeks 2 Primer	5 μl
2x KAPA HiFi HotStart PCR mix (Kapa Biosystems, USA)	15 μl

PCR viidi läbi masinaga Mastercycler (Eppendorf, Saksamaa) vastavalt järgnevatele tingimustele:

Eeldenaturatsioon	95°C	3 min	
Denaturatsioon	95°C	30 sek	} 7 tsüklit
Praimerite seostumine	55°C	30 sek	
Elongatsioon	72°C	30 sek	
Lõplik elongatsioon	72°C	5 min	
Temperatuuri hoidmine	4°C	∞	

2.2.5.4. Indeksitega märgistatud proovide puhastamine

Nextera XT indeksitega märgistatud proovide puhastamiseks kasutati Agencourt AMPure XP magnetkerakesi (Beckman Coulter, USA) tootja protokoll järgi. Proovid elueeriti 27,5 μl Tris

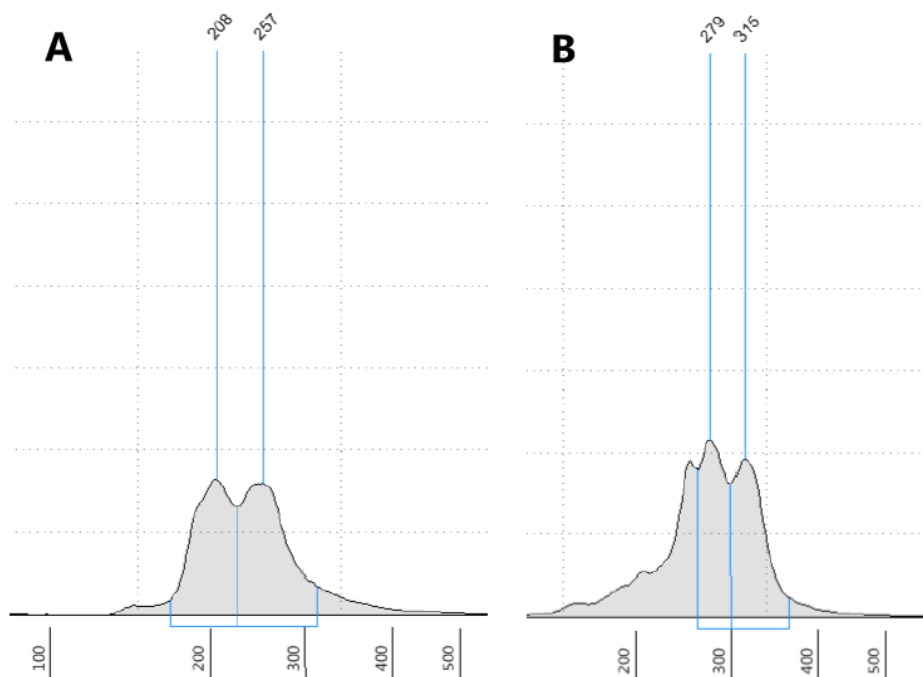
puhvril, millest kasutusele võeti 25 µl puhastatud produkti, et vältida magnetkerade ülekannet järgmisesse reaktsiooni.

2.2.5.5. Indeksitega märgistatud proovide kontsentratsiooni ja fragmentide suuruse mõõtmine

Punktis 2.2.5.4 ette valmistatud proovide kontsentratsioonid mõõdeti Qubit 2.0 fluoromeetriga kasutades Qubit dsDNA HS Assay reagente sarnaselt punktis 2.2.5.2 kirjeldatule.

Puhastatud ja indeksitega märgistatud DNA ampliconide pikkuseid kontrolliti TapeStation 2200 instrumendil (Agilent Technologies, USA) kasutades D1000 ScreenTape reagente (Agilent Technologies, USA) lähtudes tootja soovitudest Tartu Ülikooli genoomika instituudi tuumik-laboris teise töögrupi liikme poolt. Saadud tulemused visualiseeriti TapeStation (Agilent Technologies, USA) tarkvaraga.

Mõõtmisel kasutati proove EK1 ja EK2. Joonis 7 on kujutatud TapeStation 2200 instrumendiga mõõdetud proove EK1 ampliconide pikkus enne ja pärast indeksite lisamist.



Joonis 7. Proovi EK1 ampliconide pikkus mõõdetuna TapeStation 2200 instrumendil. Välja on toodud proovi EK1 ampliconide pikkus enne indeksite lisamist (A) ja pärast indeksite lisamist (B).

Proovide mõõtmine TapeStationi kiibil oli vajalik selleks, et kontrollida, kas indeksjärjestused olid seondunud adapterjärjestustele. Joonis 7 on TapeStationi mõõtmistulemustest näha, et indeksjärjestuste lisamine on olnud edukas, sest amplikonid on peale punktis 2.2.5.3 Nextera XT indekseid lisamise PCR-i pikemad.

Erinevate indeksitega märgistatud indiviidide amplikonide segud lahjendati kontsentratsioonini 10 ng/μl ning segati omavahel võrdses mahus kokku.

2.2.5.6. Proovide kvaliteedi kontroll ning sekveneerimine tuumiklaboris

Amplikonid sekveneeriti Tartu Ülikooli Genoomika instituudi tuumiklaboris teise töögrupi liikme poolt. Proovide kvaliteedi kontrolliks teostati KAPA qPCR Applied Biosystems seadmega 7900HT Fast Real-Time PCR System. Selleks kasutati KAPA Library Quantification kitti (Kapa Biosystems, USA).

TapeStationiga kontrolliti raamatukogu profiili ja määrati keskmine fragmentide pikkus. Selleks kasutati D1000 ja High Sensitivity D1000 (Agilent Technologies, USA) süsteeme vastavalt tootja protokollile. Raamatukogu ettevalmistus käis vastavalt MiSeq Reagent Kit v3 komplekti (Illumina, USA) tootjapoolsele juhistele (Illumina, USA). Raamatukogu sekveneerimiseks kasutati MiSeq sekvenaatorit (Illumina, USA), mille tulemusel saadi 2 x 250 aluspaari pikkused *paired-end* lugemid.

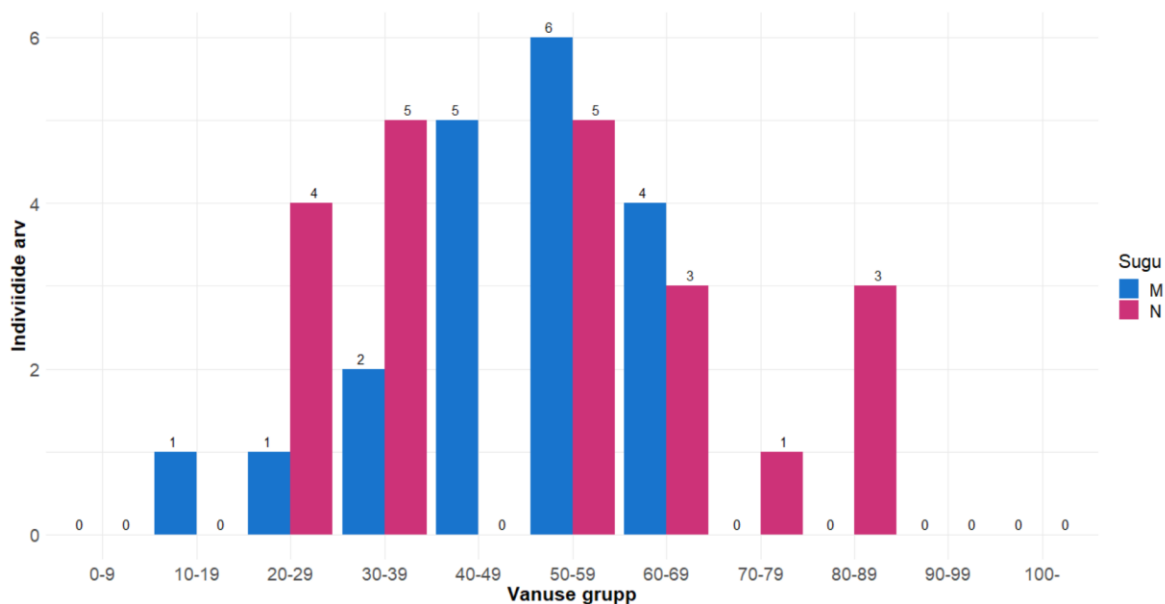
2.2.6. Andmeanalüüs

Andmete analüüsiks kasutati statistikatarkvara R-i (versioon 3.5.1; R Core Team 2018) ning viidi läbi töögrupi teise liikme poolt. Katse käigus amplifitseeriti üles 23 amplikoni, milles paiknes 93 CpG lookust. Kõik 93 CpG lookust kaasati analüüsi. Regulariseeritud lineaarse regressiooni mudel loodi kasutades R-i paketti „caret“ (versioon 6.0-82; Kuhn 2008), andmete ettevalmistamiseks kasutati pakette „dplyr“ (versioon 0.8.0.1; Wickham 2019) ja „data.table“ (versioon 1.12.0; Dowle 2019) ning visualiseerimiseks kasutati pakette „ggplot2“ (versioon 3.1.0; Wickham 2016), „ggpubr“ (versioon 0.2; Kassambara, 2018), „ggrepel“ (versioon 0.8.0; Slowikowski 2018), „pheatmap“ (versioon 1.0.12; Kolde 2019) ja „scales“ (versioon 1.0.0; Wickham 2018).

2.3. TULEMUSED

2.3.1. Valimi kirjeldus

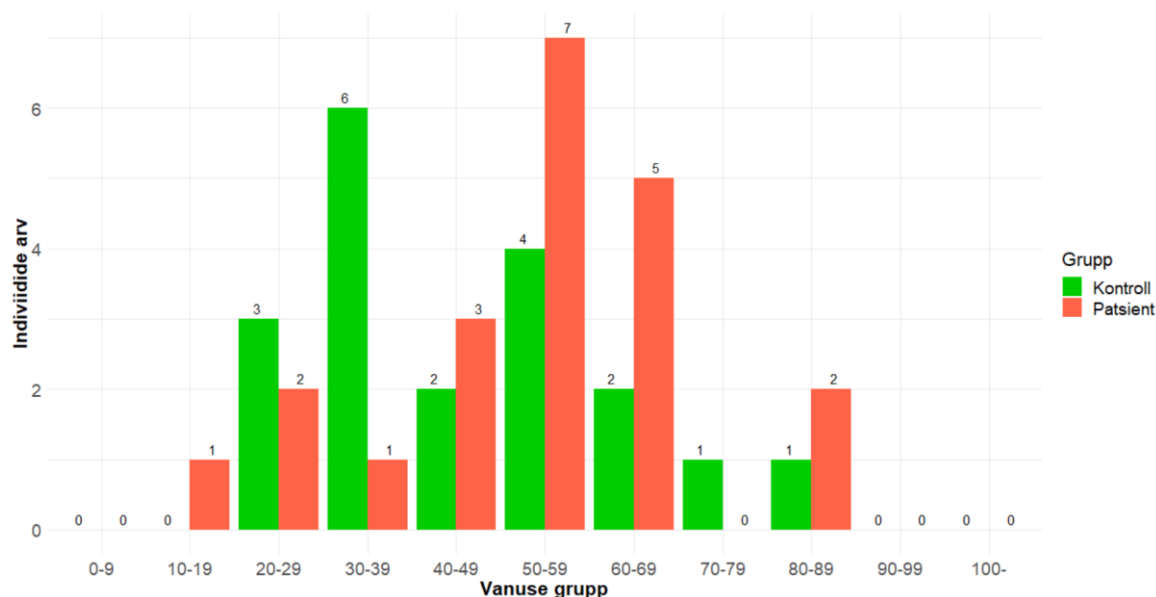
Antud katse valimisse kuulus algselt 46 sooliselt ja vanuselist sobitatud indiviidi. Kuue kontrollgruppi kuuluva indiviidi genoomse DNA eraldus ei õnnestunud, mistõttu jäid need individid uuritavast valimist välja. Joonis 8 on ära toodud uuritud 40 indiviidi vanuseline jaotus soo lõikes. Valimi keskmine vanus oli 49 eluaastat. Kõige noorem indiid oli 17-aastane, kõige vanem 85-aastane. Valimis oli kokku 21 naist ja 19 meest. Kõige rohkem naisi oli vanusegruppides 30-39 eluaastat ning 50-59 eluaastat. Meeste arv oli suurim vanusegrupis 50-59 eluaastat. Kõige noorem valimisse kuuluv meessoost isik oli 17-aastane, vanim oli 67-aastane. Naiste seas olid need vanused vastavalt 23 ja 85 eluaastat.



Joonis 8. Uuritud indiviidide vanuseline jaotus soo lõikes. Võrreldud on naiste ja meeste vanuse sagedusi erinevates vanuse gruppide vahemikes. X-teljel on vanuse gruppide vahemikud ning y-teljel indiviidide arv. Värvikoodiga on eristatud mehed (M) ja naised (N).

Katses võeti vaatluse alla tervete ehk kontrollide ja psoriaasahaigete grupp, kuhu kuulus vastavalt 19 ja 21 indiviidi. Joonis 9 on välja toodud vanuseline jaotus gruppide lõikes ja võrreldud kontrollgruppi ja psoriaasahaigete arvu erinevates vanusegruppides. Kõige rohkem oli antud valimis esindatud psoriaasahaigeid vanuses 50-59 ja terveid vanuses 30-39 eluaastat. Patsientide keskmine

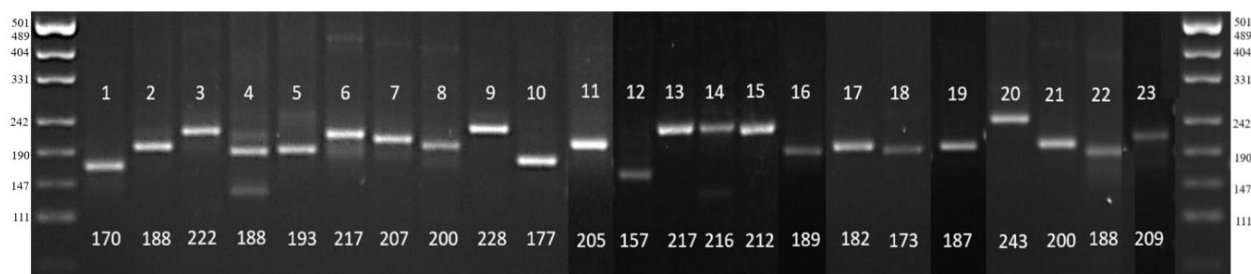
vanus uuritavas valimis oli 52 ja kontrollgrupis 45 eluaastat. Noorim psoriaasipatsient oli 17-aastane, vanim 85-aastane. Kontrollgrupis olid need vanused vastavalt 23 ja 85 eluaastat.



Joonis 9. Valimi haigete ja tervete vanuseline jaotus. X-teljel on välja toodud vanusegruppide vahemikud ning y-teljel indiviidide arv. Tervete ja psoriaasahaigete grupp on eristatud värvikoodi abil.

2.3.2. Geel-elektroforees

Uurimaks kirjeldatud valimi genoomse DNA metülatiooni tasemeid huvipakkuvates CpG lookustes, teostati naatriumbisulfit-töötamise järgne amplifikatsioon. Töös kasutatud 23 amplikoni praimerite järjestused, amplikonide pikkused ning iga amplikoni number ja lookuse asukoht kromosoomis on välja toodud Lisa 1. PCR-i efektiivsuse kontrolliks teostati geel-elektroforees. Joonis 10 on näha 23 amplifitseeritud amplikoni DNA fragmendid ühest uuritavast indiviidist EP14. Kõik amplikonid olid oodatava pikkusega.



Joonis 10. Töös kasutatud 23 amplikoni ning nende pikkused. Välja on toodud geel-elektroforeesi pilt UV-valguse all indiviidist EP14. Esimesel ja viimasel real on näha

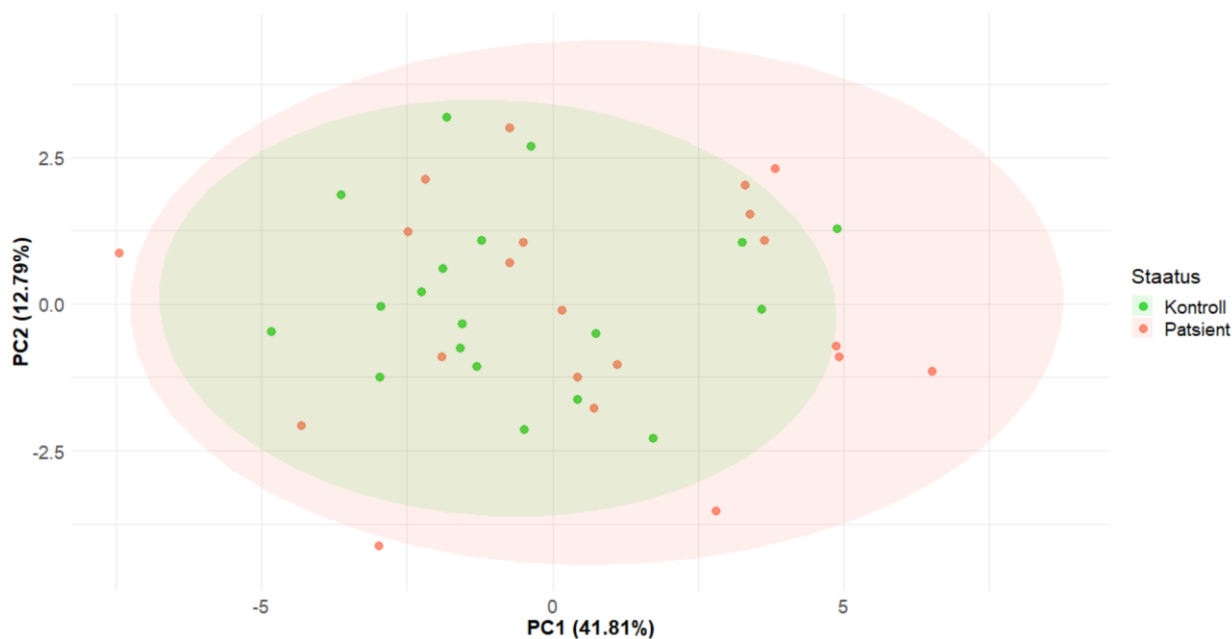
pikkusmarkerit pUC19 DNA/MspI (HpaII). Lisaks on välja toodud amplikonide numbrid ning pikkused.

2.3.3. Grupispetsiifilise DNA metülatsiooni hindamine

Antud töö üheks eesmärgiks oli hinnata CD8⁺ TEMRA rakkude proportsiooni valgete vererakkude suhtes valitud CpG lookuste metülatsioonitasemete põhjal. Hindamaks huvipakkuvate CpG lookuste metülatsioonitasemeid psoriaasahaigetes ja nendele vastavates kontrollides teostati amplifitseeritud amplikonide sekveneerimine. Enamasti sisaldasid uuritavad amplikonid ka mitmeid teisi CpG lookuseid, seega kaasati ka need lookused käesolevasse uurimistöösse. Kokku uuriti 93 CpG lookust. Varasemalt oli teostatud tunnuste valik (ingl. k. *feature selection*), mille eesmärgiks oli leida informatiivseid CpG lookuseid TEMRA rakkude tasemete jaoks. Nimelt, käsitleti CpG lookuseid tunnustena ning valiti välja need, mis aitasid mudeldada TEMRA rakkude proportsiooni kõigi valgete vererakkude suhtes. Uuringusse kaasatud 23-s amplikonis esindatud 93 CpG lookusest oli informatiivseteks 23 CpG lookust. Antud töös on näidatud eraldi tulemused nii kõigi 93 CpG lookustega (lisades) kui ka eelmainitud 23 informatiivse CpG lookustega.

Kõigepealt uuriti kontrollide ja psoriaasahaigete metülatsiooniprofiilide varieeruvust. Selleks kasutati peakomponentide analüüsi (*principal component analysis*, PCA). PCA algoritm käsitleb iga CpG lookust ühe tunnusena. Esialgsed tunnused standardiseeritakse ning nende põhjal luuakse sama arv uusi tunnuseid, mis saadakse läbi lineaarsete kombinatsioonide esialgsetest. Need uued tunnused on loodud selliselt, et esimene tunnus kirjeldub kõige suurema osa metülatsiooniprofiilide varieeruvusest, teine tunnus teise kõige suurema osa jne. Neid uusi tunnuseid nimetatakse põhikomponentideks ning visualiseerimiseks kasutatakse neist esimest ja teist, mida nimetatakse vastavalt põhikomponent 1 (PC1) ja põhikomponent 2 (PC2). Valimisse kuuluvate 40 indiviidi kõigi 93 CpG lookuse PCA joonis on välja toodud Lisa 2, kus PC1 aitab ära seletada 31,3% kogu CpG lookuste metüleerituse erinevusest, PC2 aga 13%. Vaadates ainult CD8⁺ TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste CpG lookuste PCA (joonis 12), olid protsendid suurenenud, seletades ära vastavalt 41,8% ja 12,8% kogu metülatsiooniprofiili erinevusest. Oodatava tulemusena võiksid kontrollgrupi ja patsientide grupi individid kokku klasterduda. Antud juhul ei tekkinud 93 ega 23 CpG lookuse metüleerituse alusel klasterdumist uuritavates gruppides. See-eest olid psoriaasi patsientide metülatsiooniprofiilid 23 CpG lookuse lõikes varieeruvamad võrreldes tervetega. Nii

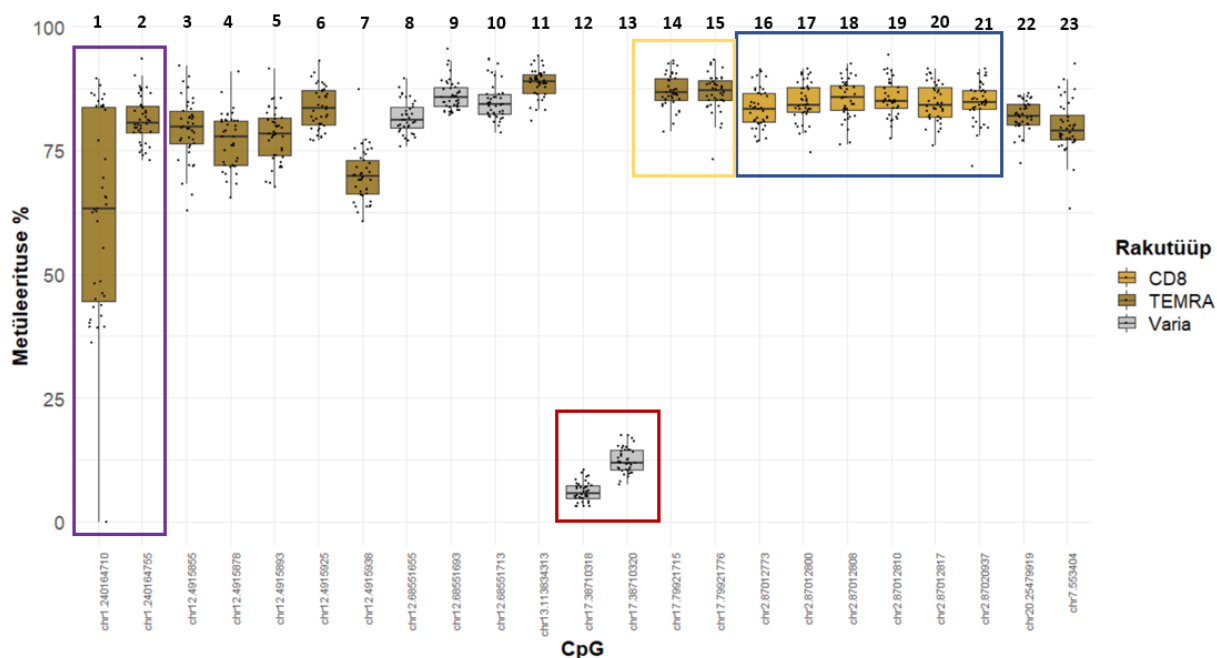
93 kui ka 23 CpG lookuse metüleerituse varieeruvuse alusel ei olnud võimalik valimisse kuuluvaid indiviide eristada kontrollidena või psoriaasihaigetena.



Joonis 11. 23 CpG lookuse metüleerituse varieeruvus kontrollide ja psoriaasihaigete gruppides. Telgedel on põhikomponendid 1 (PC1) ja 2 (PC2). Tervete ja haigete grupp on eristatud värvikoodiga. Iga punkt tähistab joonisel ühte indiviidi.

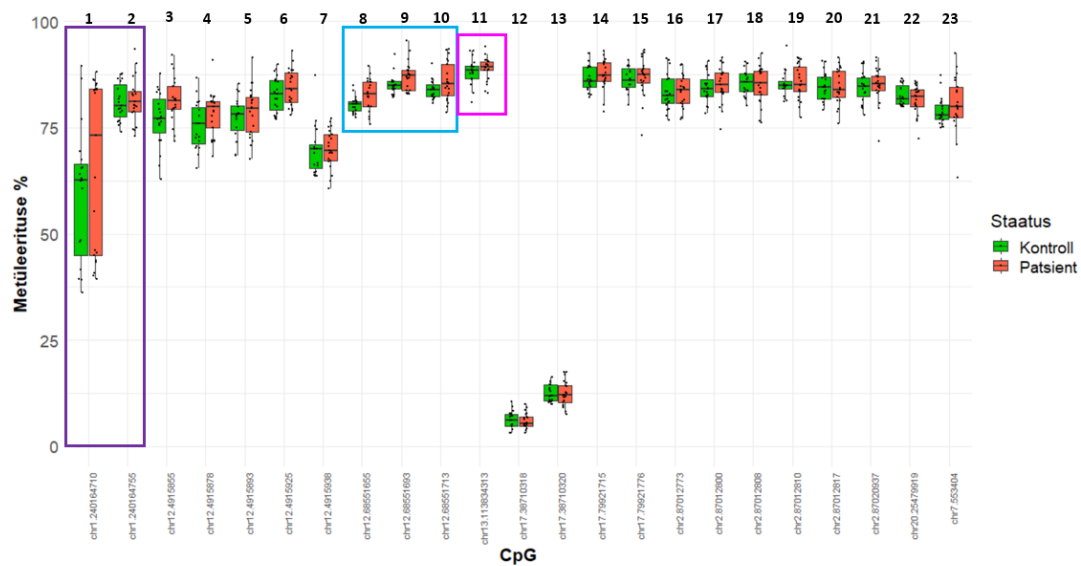
Järgmisena vaadati iga indiviidi 93 CpG lookuse metüleerituse tasemeid eraldi. Lookuste metüleerituse taseme hajuvus on kujutatud karpdiagrammina (*boxplot*) lisas 3, kus on näha, et erinevates rakutüüpides on üksteisele lähemal asuvad CpG lookused sageli sarnasemalt metüleeritud. Mõnede lookuste metüleeritus on väga varieeruv, samas leidub ka väga väikese metüleerituse varieeruvusega CpG lookuseid. Joonis 12 on välja toodud, kuidas on 23 TEMRA taseme suhtes informatiivsed CpG lookused metüleeritud (CpG lookused on tähistatud numbrita 1-23). Analüüsi on kaasatud erineva metüleerituse varieeruvusega lookuseid, näiteks kõige suurema metülatsiooni taseme varieeruvusega on 2. amplikonis geenidevahelises alas asuvad CpG lookused (Joonis 12 lilla kastiga tähistatud 1.-2. CpG lookus). 23-st uuritavast CpG lookusest kõige ühtlasema metüleerituse tasemega on 4. amplikonis asuvad CD8A geeni CpG lookused, mis on tähistatud tumesinise kastiga (Joonis 12 16.-21. CpG lookus) ja 20. amplikonis asuvad CpG lookused (Joonis 12 kollase kastiga tähistatud 14.-15. CpG lookus). TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste lookuste metüleerituse tase oli enamasti kõrge, erandiks oli 19. amplikonis

CCR7 geenis paiknevate CpG lookuste madal metüleerituse tase (Joonis 12 punase kastiga tähistatud 12.-13. CpG lookus).



Joonis 12. CD8⁺ TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste CpG lookuste metüleerituse protsent. X-teljel on välja toodud CpG lookuse asukohad kromosoomis ning y-teljel metüleerituse protsent. Värvikoodiga on eristatud erinevad rakutüübid. Kõige suurema metülatiooni taseme varieeruvusega CpG lookused on tähistatud lilla, kõige ühtlasema metüleerituse tasemega CpG lookused tumesinise ja kollase ning oluliselt madalama metüleerituse tasemega CpG lookused punase kastiga.

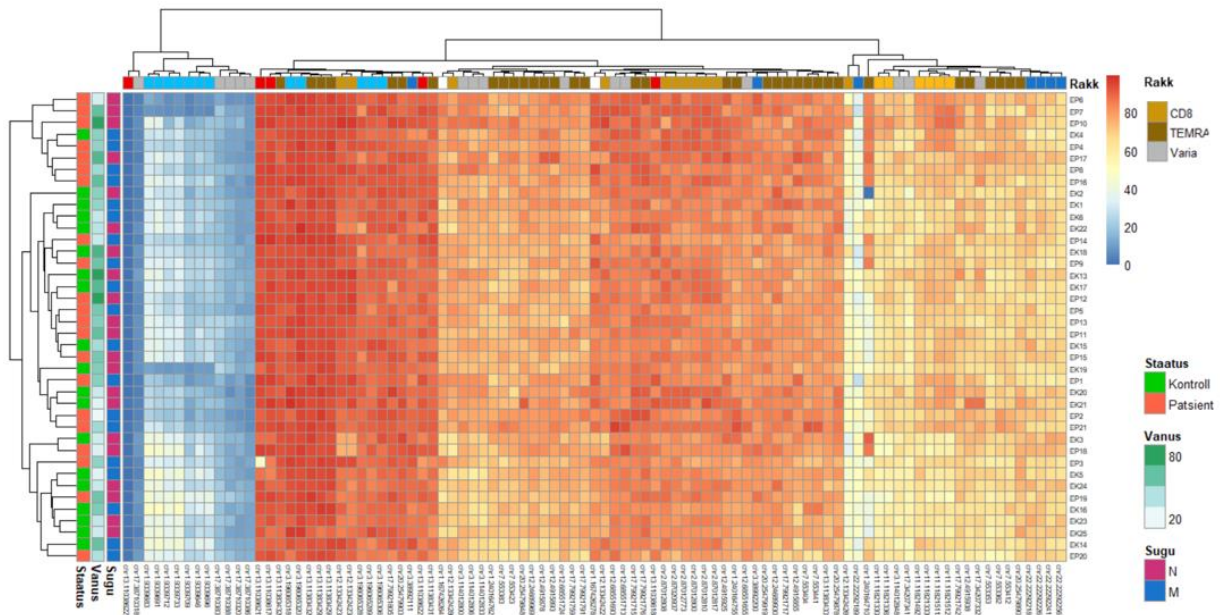
Metülatioonitasemed uuritud kontrollide ja patsientide grupis on kujutatud Joonis 13. Uuritavate indiviidide 93 CpG lookuse metülatioonitaseme gruppide lõikes on välja toodud Lisa 4. CpG lookuste metüleerituse varieeruvus uuritavates gruppides on amplikoniti erinev, kuid paljudes amplikonides on haigustingimustes metüleerituse protsent varieeruvam ja kõrgem kui tervetel indiviididel (Joonis 13 8.-10. CpG lookus). Samuti Joonis 12 välja toodud kõige suurema üldise metülatioonitaseme varieeruvusega CpG lookuse suur variatsioon tuleb just haigete grupi suurest erinevusest (Joonis 13 lilla kast). Samas leidub ka CpG lookuseid, mille metüleeritusetase on psoriaasi korral tunduvalt kõrgema ja väiksema varieeruvusega (Joonis 13 roosa kastiga tähistatud 11. CpG lookus).



Joonis 13. CD8⁺ TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste CpG lookuste metülatsioonitasemete võrdlus kontrollides ja haigetes. X-teljel on välja toodud CpG lookuse asukohad kromosoomis ning y-teljel metüleerituse protsent. Grupid on eristatud värvikoodiga. Lilla kastiga on tähistatud ühes amplikonis kõige suurema metüleerituse varieeruvusega, helesinisega haigustingimustes suurema metüleerituse tasemega ja roosa kastiga on näidatud kõige drastilisemat erinevust omavad CpG lookused.

2.3.4. Uuritud CpG lookuste metülatsiooniprofiilid

Edasi vaadati, kas uuritavate CpG lookuste metüleerituse tase on seotud vanuse, soo ja kindlasse gruppi kuuluvusega. Lisaks uuriti, kas sarnaste rakupopulatsiooni informatsioon klasterdub kokku. Seda kõike aitas väljendada kuumakaart (*heatmap*). CD8⁺TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste CpG lookustega kuumakaart on välja toodud Joonis 14. Sarnasemate metüleerituse profiilidega inividid paiknevad kõrvuti. Vasakus servas on välja toodud gruppi kuuluvus, mille alusel esineb osaline klasterdumine, mis tähendab seda, et kontrollgruppi kuuluvate inividide metüleerituse profiil on omavahel sarnasem võrreldes patsientide metülatsiooniprofiiliga. Jooniselt on näha ka lookused, mille sees võib täheldada suuri metüleerituse erinevusi inividide vahel. Selliselt käitub 2. amplikonis geenide vahelises alas paiknev CpG lookus (Joonis 14 vasakult 3. CpG lookus). Kõige drastilisema metülatsiooni erinevusega on CCR7 geenis asuvad CpG lookused, mis on väga madala metüleerituse tasemega võrreldes teiste uuritavate CpG lookustega (Joonis 14 vasakult 1. ja 2. CpG lookus).



Joonis 14. CD8⁺ TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste CpG lookuste metüleerituse profiil.

Reas on välja toodud individid, nende vanus, sugu ja gruppi kuuluvus (kontroll/patsient). Tulbas on CpG lookuste asukoht kromosoomis. Iga nelinurk näitab ühe lookuse metüleerituse taset ühel indiviidil. Värvikoodiga on eristatud erinevad rakutüübid, gruppi kuuluvus, vanus, sugu ja metüleerituse tase.

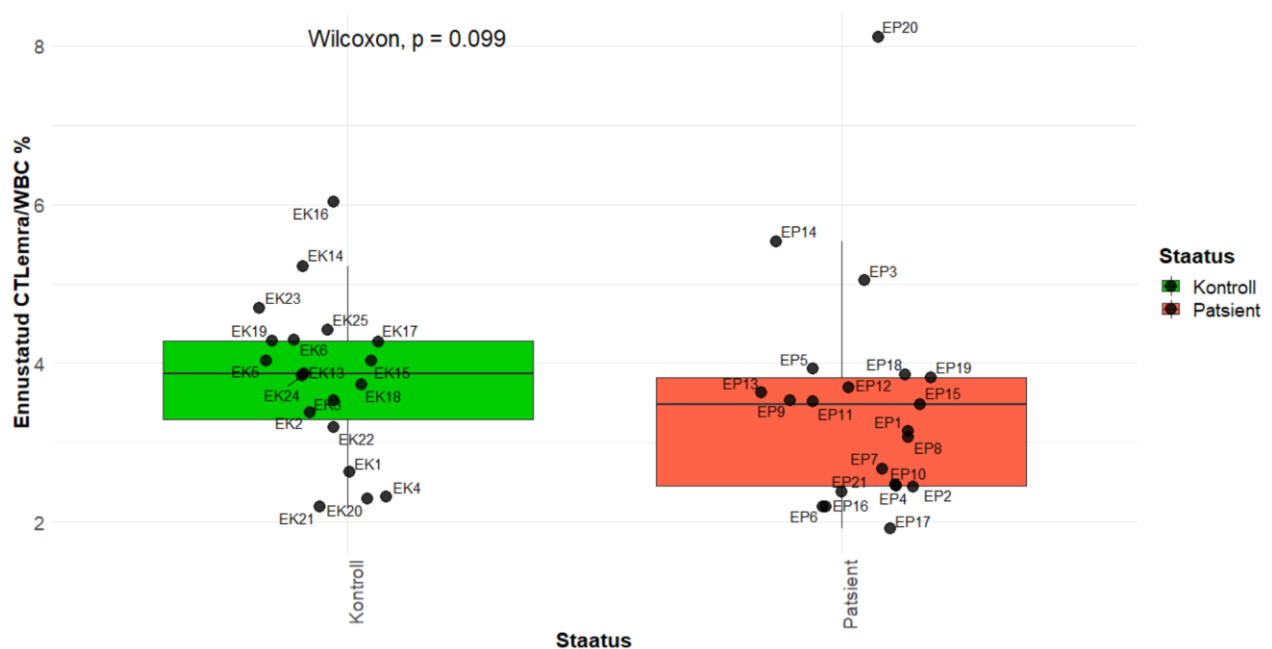
93 CpG lookuse kuumakaart on välja toodud Lisa 5, kuna sellel pildil on esindatud mitmete erinevate rakutüüpide iseloomustamiseks välja valitud CpG lookused, siis saab antud jooniselt jälgida ka klasterdumist sarnaste rakutüüpide kaupa. Näiteks paiknevad tihti kõrvuti TEMRA rakkude iseloomustamiseks valitud lookused (märgitud pruunika värvusega). Samuti võib kõikide 93 CpG lookuse kuumakaardil näha osalist vanuselist klasterdumist, kus tumedama värviga märgistatud kõrgema vanusega individid paiknevad joonisel kõrvuti.

2.3.5. CD8⁺ TEMRA rakkude arvu ennustamine varem loodud mudeliga psoriaasi korral

Antud töö fookuses on CD8⁺ TEMRA rakud, mille osakaal suureneb vananedes ja põletikulistes protsessides, seal hulgas psoriaasi korral. Selle töö kontekstis on CD8⁺ TEMRA rakkude sünonüümina kasutatud järgnevatel joonistel CTLeMra. TEMRA rakkude arvu ennustamiseks on varasemalt Tartu Ülikooli molekulaarpatoloogia laboris teiste töötajate poolt välja töötatud mudel, mis kombineerides CpG lookuste metüülatsiooni väärtuseid erinevate immuunrakkude

alampopulatsioonide voolutsütomeetria tulemustega, aitab ennustada TEMRA rakkude arvu kõigi valgete vererakkude hulgast. Mudel kasutas antud rakkude arvu ennustamiseks seitset CpG lookust.

Valimisse kuuluvate indiviidide mudeli poolt ennustatud TEMRA väärtused on visualiseeritud karpdiagrammina Joonis 15. Oodatava tulemusena peaks esinema TEMRA väärtuste erinevus uuritavates gruppides, mille alusel eristada terveid indiviide ja psoriaasihaigeid. Antud analüüsist see kahjuks selgelt välja ei tule, sest ennustuste jaotused on suuresti ülekattes. Nii kontroll- kui ka psoriaasihaigete grupis esineb kõrgemaid ja madalamaid TEMRA väärtuseid.



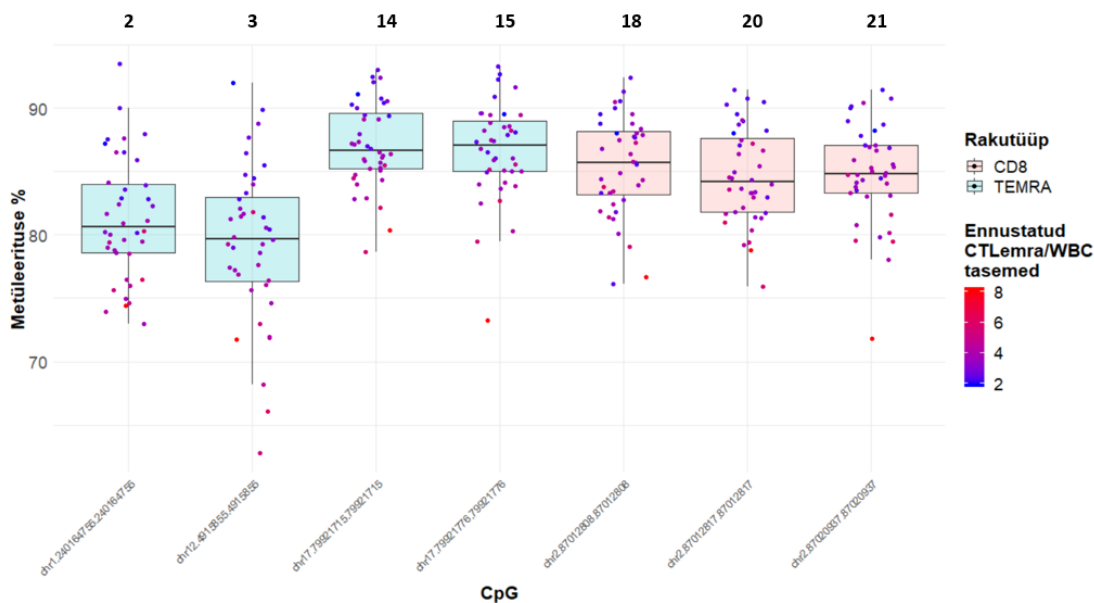
Joonis 15. Mudeli põhjal ennustatud TEMRA rakkude proportsioon kontrollide ja psoriaasihaigete patsientide grupis. X-teljel on välja toodud grupp, y-teljel ennustatud TEMRA rakkude proportsioon kõigi valgete vererakkude hulgast. TEMRA väärtuste hajuvust kahe grupi lõikes on näidatud karpdiagrammidena. Iga punkt tähistab ühe indiviidi TEMRA rakkude proportsiooni valgete vererakkude hulgast, indiviidide kood on välja toodud punktide juures.

Osadel patsientidel oli mudeli põhjal ennustatud TEMRA väärtused siiski kõrgemad. Näiteks patsiendil EP20 esines lisaks naastulisele psoriaasile ka glaukoom, kuid otseselt kõrgemate TEMRA väärtustega seda seostada ei saa (Chandran et al. 2007). Patsiendil EP14 esines tilkpsoriaas, mistõttu võib TEMRA väärtus olla võrreldes teiste naastulise psoriaasi patsientidega kõrgem. Tilkpsoriaas avaldub sageli juba lapseas, eluaja jooksul jõuab organismi kuhjuda rohkem

TEMRA rakke, seepärast võis esineda ka kõrgem TEMRA väärtus. Patisendil EP3 esineb lisaks naastulisele psoriaasile ka muu psoriaasivorm. Mõnel kontrollgrupi indiviidil oli ennustatud TEMRA rakkude väärtus samuti kõrge. Paljudel esines erinevaid seenhaigusi, seal hulgas indiviidil EK16, kuid psoriaasi ja seenhaiguse vahel ei ole seni seost leitud. Seega ei tohiks mõjutada saadud tulemusi. (Salomon et al. 2003; Szepietowski ja Salomon 2007).

2.3.6. CD8⁺ TEMRA rakkude väärtuste ennustamiseks kasutatud CpG lookused

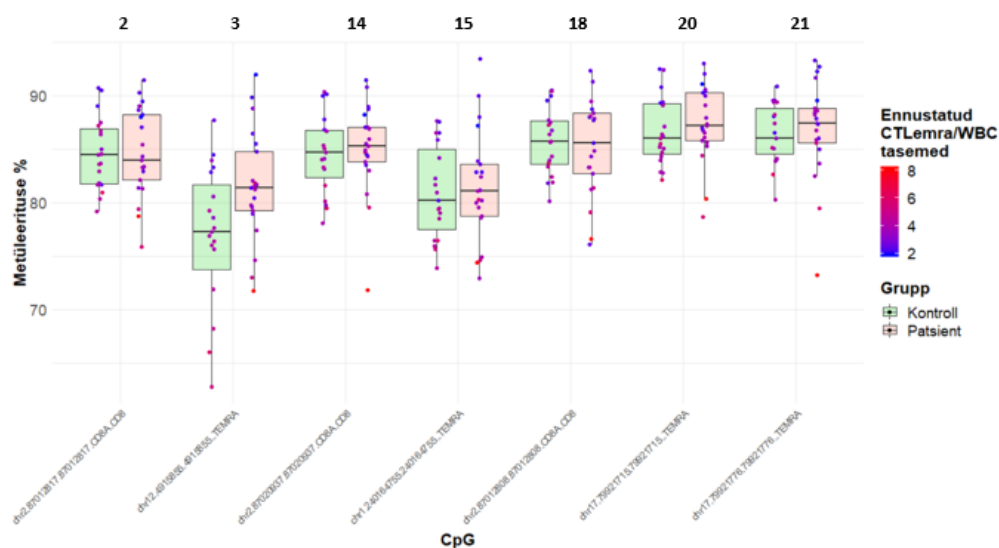
TEMRA rakkude väärtuste ennustamiseks kasutas mudel 23-st TEMRA-le olulistest CpG lookusest seitset kõige informatiivsemat, mis on välja toodud Joonis 16 ja tähistatud numbritega vastavalt TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste 23 CpG lookuse numeratsioonile Joonis 12 ja 13 toodud järjekorrale. Nendest CpG lookustest 2, 3, 14 ja 15 paiknevad geenidevahelises alas ning lookused 18, 20 ja 21 asuvad CD8A geenis. CD8A geen on oluline tsütotoksiliste T-rakkude aktivatsiooniks.



Joonis 16. Rakkude arvukuse ennustamiseks kasutatud CpG lookuste metüleerituse tase uuritavatel indiviididel. X-teljel on välja toodud CpG lookuste, mille põhjal mudel ennustas TEMRA väärtused, asukohad kromosoomis ja y-teljel metüleerituse protsent. CpG lookuste metüleerituse hajuvus on visualiseeritud karpdiagrammina, kus iga punkt tähistab ühte indiviidi. Värvikoodiga on eristatud rakutüüp ning ennustatud TEMRA väärtused vahemikus 2-8. CpG lookuste numeratsioon põhineb joonisel 13 ja 14 toodud järjekorral.

Joonis 16 on kujutatud mudelis kasutatud CpG lookuste ja metülatsoonitaseme seost TEMRA väärtuste ennustamisega. Iga indiviid värviti vastavalt ennustatud TEMRA rakkude proportsioonile valgete vererakkude arvust. Kuna ennustatud väärtused jäid vahemikku 2-8, on ka värvikoodiga eristatud just sellesse vahemikku jäävad TEMRA rakkude väärtused. Kõigi seitsme lookuse lõikes on näha, et mida kõrgem on ennustatud TEMRA rakkude proportsioon, seda madalamalt on lookused metüleeritud. Seega antud CpG lookuste puhul tähendab madal metüleeritus kõrget TEMRA rakkude proportsiooni.

CpG lookuste ja mudeli ennustatud TEMRA väärtuste seosed uuritavate gruppide lõikes on näidatud ka Joonis 17. Metüleerituse hajuvus on nende seitsme CpG lookuse põhjal suurem psoriaasihaigetes. Nii 14. kui ka 21. CpG lookuses on psoriaasihaigete grupis näha paaril indiviidil tunduvalt väiksemat metüleerituse taset. Kõige drastilisem keskmine metüleerituse erinevuses uuritavate gruppide vahel on 3. CpG lookuses (Joonis 17).



Joonis 17. Rakkude arvukuse ennustamiseks kasutatud CpG lookuste metüleerituse tase uuritavatel indiviididel gruppide lõikes. X-teljel on välja toodud CpG lookuste, mille põhjal mudeli ennustas TEMRA väärtused, asukohad kromosoomis ja y-teljel metüleerituse protsent. CpG lookuste metüleerituse hajuvus on visualiseeritud karpdiagrammina, kus iga punkt tähistab ühte indiviidi. Värvikoodiga on eristatud rakutüüp ja ennustatud TEMRA väärtused. CpG lookuste numeratsioon on sama nagu toodud joonisel 18.

2.4. ARUTELU

Psoriaas on põletikuline nahahaigus, mis on vahendatud T-rakkude poolt. Haiguse välja kujunemisel on kesksel kohal Th rakud. Muutunud T-rakkude alampopulatsioonide profiil peegeldab sageli inimese haiguslikku seisundit. Teatud tööd on näidanud ka TEMRA rakkude, mille osakaal kogu T-rakkude hulgast suureneb põletikulistes protsessides, osalust psoriaasi tekkel (Šahmatova et al. 2017; Martin ja Badovinac 2018; Pereira ja Akbar 2016).

Seni on immuunrakkude profiili määramiseks kasutatud voolutsütomeetriat, mis aitab kvantitatiivselt hinnata erinevate immuunrakkude alampopulatsioonide osakaalu. Tegu on aga kalli ja aega-nõudva analüüsiga. Selle analüüsi üheks alternatiiviks võiks olla DNA metülatsioonimustri kasutamine erinevate rakutüüpide proportsioonide eristamiseks. Üldjuhul kasutatakse mitmeid CpG lookuseid, sest lookuse metüleerituse tase võib rakutüübiti ja erinevates kudedes varieeruda. Seega tagab mitme CpG lookuse kasutamine täpsema tulemuse (Horvath and Raj 2018).

DNA metülatsioonil on oluline roll geenide avaldumises ja rakkude funktsioneerimises. Diferentseerumise käigus rakkude metülatsioonimuster muutub. Erineva DNA metüleerituse alusel on võimalik eristada erinevaid rakutüüpe, seal hulgas immuunrakke (Accomando et al. 2014). Mudelite täpsuse hindamiseks võrreldakse tulemusi voolutsütomeetriaga kasutades selle andmeid referentsina. Näiteks, qPCR-il (kvantitatiivne PCR) põhinev T-rakkude proportsioonide hindamise meetod suudab ennustada reguleerivate T-rakkude (*regulatory T cell*, Treg), Th ja CD8⁺ T-rakkude osakaalu sarnaselt voolutsütomeetriaal (Baron et al. 2018).

Seni on suudetud välja töötada erinevaid mudeleid, mille abil suudetakse hinnata immuunrakkude proportsiooni veres. Praeguste meetoditega on võimalik ennustada seitsme suurema leukotsüüdi alatüübi (T-rakud, B-rakud, looduslikud tapja-T-rakud, monotsüüdid, eosinofiilid, basofiilid ja neutrofiilid) proportsioone (Houseman et al. 2015). 20 CpG lookuse abil on pea 100%-lise täpsusega võimalik hinnata nende rakutüüpide proportsioone veres olles heaks alternatiiviks voolutsütomeetriaal (Accomando et al. 2014). Väikemate alatüüpide, näiteks CD8⁺ TEMRA rakkude proportsiooni hindamiseks sobivad metülatsioonipõhiseid meetodeid veel välja töötatud pole, aga on leitud sobivaid CpG lookuseid, mille alusel oleks TEMRA rakke võimalik eristada teistest T-mälurakkudest (Rodriguez et al. 2017).

Rakutüüpide proportsioonide ennustamiseks kasutatakse CpG lookuseid, mille metüleerituse tase on erinev võrreldes teiste rakutüüpidega. Tihti valitakse CpG lookused nendest geenidest, mis on

konkreetses rakutüübi funktsioneerimiseks olulised. Näiteks, CD3⁺ rakkude (T-rakkude) ennustamiseks sobivad lookused asuvad geenides CD3G ja CD3D. (Baron et al. 2018). Nii CD3G kui ka CD3D geenid on olulised immuunvastuse tekkes ja T-rakkude aktiveerumises.

Antud bakalaureusetöö seitse CpG lookust, mille alusel ennustati TEMRA väärtused, asusid peamiselt geenidevahelises alas, kuid kolm CpG lookust asusid CD8A geenis, mis on oluline CD8⁺ T-rakkude aktiveerumiseks.

Üks töö eesmärkidest oli kontrollida, kas molekulaarpatoloogia laboris teiste töögrupi liikmete poole loodud rakkude arvu ennustamise mudel töötab psoriaasi tingimustes ja hinnata valitud TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste lookuste metülatiooni tasemete väärtuseid psoriaasahaigetes patsientides ja tervetes. Vaatluse alla võeti 23 erinevat amplikoni, mis sisaldasid 93 CpG lookust, millest omakorda 23 osutus edaspidises analüüsis TEMRA rakkude arvu ennustamiseks olulisteks. Mudel kasutas nendest 23-st CpG lookusest seitset kõige informatiivsemat lookust, mis asusid kas geenidevahelises alas või CD8A geenis. CD8A geenides paiknevate CpG lookuste metüleeritus oli sarnasem võrreldes teise nelja CpG lookustega.

Analüüsi kaasatud 93 CpG lookuste metüleerituse tase oli väga varieeruv. Leidus nii väga hajusa kui ka väga väikese metüleerituse varieeruvusega lookuseid. Seda võis mõjutada amplikonide ja CpG lookuste füüsiline distant. Samas amplikonis üksteisele lähemal asuvad CpG lookused olid sageli sarnasemalt metüleeritud. Kõige erinevamad CpG lookuste metüleerituse tasemed esinesid TEMRA rakkude iseloomustamiseks valitud geenidevahelistes alades paiknevates lookustes, kus sama amplikoni sees olid üksteisele lähedal asuvad lookused väga erineva metüleerituse tasemega. Samas selgus, et TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste CpG lookuste metüleerituse hajuvus on psoriaasahaigetel tunduvalt suurem võrreldes tervete indiviididega.

Uuritava valimi CpG lookuste metüleerituse alusel ennustati indiviidide TEMRA rakkude proportsiooni kõigi valgete vererakkude suhtes, kuid kahjuks ei eristunud nende väärtuste põhjal kontrollide ja psoriaasahaigete grupp. Selle põhjusteks võivad olla mitmed asjaolud. Uuritavasse valimisse kuulus algselt 46 sooliselt ja vanuselist sobitatud indiviidi. Kuna kuue kontrollproovi genoomse DNA eraldus ei õnnestunud, siis muutis see natuke valimi tasakaalu. Seetõttu polnud mõnel psoriaasiga inimesel kontrollgrupis vanuseliselt ja sooliselt sobitatud indiviidi ja vastupidi. Sellegipoolest olid uuritavates gruppides keskmised vanused sarnased. Antud katse puuduseks oli kindlasti ka valimi suurus. Kui oleks kaasatud rohkem inimesi ja uuritud kindlasse

vanusevahemikku jäävaid indiviide, siis võiksid tulemused võib olla rohkem erineva uuritavates gruppides. Psoriaasahaigete grupi miinuseks oli ka paljud kaasuvad haigused, mis võisid mõjutada saadud tulemusi, kuid samas esines kergemaid tervisehäireid ka tervete grupis. Lisaks esines enamikel haigetel naastuline psoriaas, kuid esindatud olid ka teised psoriaasivormid.

Käesolev töö põhines bioloogilisel hüpoteesil, et põletikulistes tingimustes $CD8^+$ TEMRA rakkude osakaal kasvab. Võib olla see bioloogiline hüpotees ei ole nii paika pidav kui oodatud ning sellest tulenesid antud uurimuse tulemuste vastuolud. Mudel ennustas igale indiviidile kõigist valgetest vererakkudest TEMRA rakkude proportsiooni, aga kuna tulemusi ei saa kontrollida referentsiga, siis pole teada, kui täpsed saadud tulemused on.

Varasemalt ei ole välja töötatud väiksemate rakualatüüpide ennustamiseks metülatsioonipõhiseid mudeleid. Kuigi psoriaasi korral ei saanud välja töötatud mudeli põhjal ennustatud $CD8^+$ TEMRA rakkude väärtuste alusel eristada psoriaasipatsiente ja terveid, on sellel siiski väga suur potentsiaal edasi arendades meditsiinilises diagnostikas.

KOKKUVÕTE

Psoriaas on põletikuline nahahaigus, mis on vahendatud T-rakkude poolt. Kesksel kohal on just T-abistaja rakud, aga osad tööd on tõestanud haiguse väljakujunemisel ka CD8⁺ TEMRA rakkude osalust, mille osakaal kogu T-rakkude hulgast kasvab põletikulistes protsessides. CD8⁺ TEMRA rakkude proportsiooni hindamiseks psoriaasi korral kasutati käesolevas töös DNA metülatsiooni.

Katse valimisse kaasati Tartu Ülikooli Kliinikumi Nahahaiguste kliniku 21 psoriaasihaiget ja 19 kontrollindiviidi. Uuritavatelt indiviididelt eraldati perifeersest verest genoomne DNA ning analüüsiti valitud CpG lookuste metülatsiooni tasemeid.

Antud bakalaureusetööl oli kaks eesmärki. Esimene eesmärk oli kirjeldada valitud CD8⁺ TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste CpG lookuste metülatsiooni tasemete väärtuseid psoriaasihaigetel patsientidel ja tervetel. Analüüsi kaasati 93 CpG lookust, mille metüleerituse tase oli väga varieeruv. Nendest 93-st CpG lookusest osutusid TEMRA väärtuste ennustamiseks olulisteks 23 CpG lookust. Metülatsiooniväärtuste analüüsis selgus, et TEMRA rakkude ennustamiseks oluliste CpG lookuste metüleerituse hajuvus on psoriaasihaigetel suurem võrreldes tervete indiviididega.

Töö teine eesmärk oli kontrollida, kas molekulaarpatoloogia laboris teiste töögrupi liikmete poole loodud CD8⁺ TEMRA rakkude proportsiooni ennustamise mudel annab varasemate hüpoteesidega kooskõlas tulemusi psoriaasi haigetel. Mudel põhineb CpG lookuste metülatsiooni väärtuste kombineerimisel erinevate immuunrakkude alampopulatsioonide voolutsütomeetria tulemustega ja kasutas 23-st TEMRA-le olulistest CpG lookustest seitset kõige informatiivsemat. Antud analüüsi põhjal ei tulnud välja TEMRA väärtuste erinevusi uuritavates gruppides, mille alusel eristada psoriaasihaigeid ja terveid indiviide.

Evaluation of CD8⁺ TEMRA cells in psoriasis

Anella Salmistu

SUMMARY

Psoriasis is an inflammatory skin disease mediated by T cells which results in complex interactions between T cells, dendritic cells and keratinocytes. It is known that there is an increase of CD8⁺ TEMRA cells in pro-inflammatory diseases and during ageing.

Current study included 21 psoriasis patients and 19 controls from Dermatology Clinic of Tartu University Hospital. Peripheral blood samples were collected and site-specific DNA methylation of 93 CpG sites were analyzed from white blood cells.

The purpose of the current thesis was to evaluate the changes in methylation profile of the most relevant CpG sites for prediction of CD8⁺ TEMRA cells in psoriasis patients and controls. In total there were 93 CpG sites in analysis. Out of these 93 CpG sites 23 sites were relevant for evaluation of CD8⁺ TEMRA cells percentages. It was found that these 23 CpG sites had slightly increased and more variable methylation levels in psoriasis patients compared to controls.

The second aim of the thesis was to quantify the proportion of CD8⁺ TEMRA cells using the model, that has been generated by the University of Tartu Molecular Pathology Research Group and to predict immune cell composition using site-specific methylation data. The model used seven most informative CpG sites to predict CD8⁺ TEMRA proportion which were selected out of these aforementioned 23 CpG sites. It was expected to detect differences in proportion of CD8⁺ TEMRA cells among white blood cells in psoriasis patients and controls. However, there were no significant differences in predicted CD8⁺ TEMRA fractions within two groups so that individuals could be defined as controls or psoriasis patients based on TEMRA percentages.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada oma juhendajaid Liina Tserelit, Ahto Salumetsa ja Lili Milanit. Suurimad tänusõnad lähevad Liina Tserelile, kes oli abiks katsete läbiviimisel ja bakalaureusetöö valmimisel. Suur tänu ka Ahto Salumetsale, kes aitas tulemuste analüüsimisega. Lisaks lähevad tänusõnad kogu molekulaarpatoloogia uurimisgrupile, kelle poole sain alati oma küsimustega pöörduda, ja lähedastele nende toetuse ja julgustuse eest.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Accomando, W. P., Wiencke, J. K., Houseman, E.A., et al. (2014). Quantitative reconstruction of leukocyte subsets using DNA methylation. *Genome Biol.* 15:R50.
- Ainsworth, C. (2012). Immunology: A many layered thing. *Nature* 492:S52.
- Alokail, M. S., Alenad, A. M. (2015). DNA Methylation. *Concise Rev Mol Pathol Breast Cancer*.
- Augustin, M., Reich, K., Glaeske, G. G., et al. (2010). Co-morbidity and age-related prevalence of psoriasis: Analysis of health insurance data in Germany. *Acta Derm Venereol* 90:147–151.
- Baliwag, J., Barnes, D. H., Johnston, A. (2015). Cytokines in psoriasis. *Cytokine* 73:342–350.
- Baron, U., Werner, J., Schildknecht, K., et al. (2018). Epigenetic immune cell counting in human blood samples for immunodiagnostics. *Sci Transl Med* 10:eaan3508.
- Boehncke, W. H., Schön, M. P. (2015). Psoriasis. *The Lancet* 386:983–994.
- Cai, Y., Fleming, C., Yan, J. (2012). New insights of T cells in the pathogenesis of psoriasis. *Cell Mol Immunol* 9:302–309.
- Chandra, A., Ray, A., Senapati, S., Chatterjee, R. (2015). Genetic and epigenetic basis of psoriasis pathogenesis. *Mol Immunol* 64:313–323.
- Chandran, N. S., Greaves, M., Gao, F., et al. (2007). Psoriasis and the eye: Prevalence of eye disease in Singaporean Asian patients with psoriasis. *J Dermatol* 34:805–810.
- Ciccarone, F., Tagliatesta, S., Caiafa, P., Zampieri, M. (2018). DNA methylation dynamics in aging: how far are we from understanding the mechanisms? *Mech Ageing Dev* 174:3–17.
- Crow, J. M. (2012). Psoriasis uncovered. *Nature* 492:S50–S51.
- Deaton, A. M., Webb, S., Kerr, A. R. W., et al. (2011). Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system. *Genome Res* 21:1074–1086.
- Dor, Y., Cedar, H. (2018). Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *The Lancet* 392:777–786.
- Duvallet, E., Semerano, L., Assier, E., et al. (2011). Interleukin-23: A key cytokine in inflammatory diseases. *Ann Med* 43:503–511.

- Dowle, M., Srinivasan, A., Goreckim J., et al (2019). data.table: Extension of data-frame. <https://cran.r-project.org/package=data.table>.
- Farber, E. M., Nall, M. L. (1974). The natural history of psoriasis in 5600 patients. *Dermatologica* 148:1-18.
- Fredriksson, T., Pettersson, U. (1978). Severe Psoriasis – Oral Therapy with a New Retinoid. *Dermatology* 157:238–244.
- Futscher, B. W., Oshiro, M. M., Wozniak, R. J., et al. (2002). Role for DNA methylation in the control of cell type-specific maspin expression. *Nat Genet* 31:175–179.
- Girolomoni, G., Mrowietz, U., Paul, C. (2012). Psoriasis: rationale for targeting interleukin-17. *Br J Dermatol* 167:717–724.
- Golubovskaya, V., Wu, L. (2016). Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers* 8(3):36.
- Griffiths, C. E., Baker, J. N. (2007). Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *The Lancet* 370:263-271.
- Griffiths, C. E., Christophers, E., Barker, J. N., et al. (2007). A classification of psoriasis vulgaris according to phenotype. *Br J Dermatol* 156:258–262.
- Gupta, R., Debbaneh, M. G., Liao, W. (2014). Genetic Epidemiology of Psoriasis. *Curr Dermatol Rep* 3:61–78.
- Hamann, D., Baars, P. A., Rep, M. H. G., et al. (1997). Phenotypic and Functional Separation of Memory and Effector Human CD8+ T Cells. *J Exp Med* 186:1407–1418.
- Hawkes, J. E., Chan, T. C., Krueger, J. G. (2017). Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *J Allergy Clin Immunol* 140:645–653.
- Hayes, J., Koo, J. (2010). Psoriasis: depression, anxiety, smoking, and drinking habits. *Dermatol Ther* 23:174–180.
- Henseler, T., Christophers, E. (1985). Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris. *J Am Acad Dermatol* 12:450-6.

- Heyn, H., Esteller, M. (2012). DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet* 13:679–692.
- Ho, A. W., Kupper, T. S. (2019). T cells and the skin: from protective immunity to inflammatory skin disorders. *Nat Rev Immunol*.
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14:R115.
- Horvath, S., Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet* 19:371–384.
- Houseman, E. A., Accomando, W. P., Koestler, D. C., et al. (2012). DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics* 13:86.
- Houseman, E. A., Kim, S., Kelsey, K. T., Wiencke, J. K. (2015). DNA Methylation in Whole Blood: Uses and Challenges. *Curr Environ Health Rep* 2:145–154.
- Howell, M., Shepherd, M. (2018). The immune system. *Anaesth Intensive Care Med* 19:575–578.
- Jiang, S., Hinchliffe, T. E., Wu, T. (2015). Biomarkers of An Autoimmune Skin Disease—Psoriasis. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13:224–233.
- Jin, Z., Liu, Y. (2018). DNA methylation in human diseases. *Genes Dis* 5:1–8.
- Johnson, A. A., Akman, K., Calimport, S. R. G., et al, (2012), The Role of DNA Methylation in Aging, Rejuvenation, and Age-Related Disease. *Rejuvenation Res* 15:483–494.
- Jung, M., Pfeifer, G. P. (2015). Aging and DNA methylation. *BMC Biol* 13:7.
- Kassambara, A. (2018). ggpubr: ggplot2 Based Publication Ready Plots. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Kaushal, A., Zhang, H., Karmaus, W. J. J., et al. (2017). Comparison of different cell type correction methods for genome-scale epigenetics studies. *BMC Bioinformatics* 18(1):216.
- Khairutdinov, V. R., Mikhailichenko, A. F., Belousova, I. E., et al. (2017). The role of intradermal proliferation of T-cells in the pathogenesis of psoriasis. *An Bras Dermatol* 92:41–44.
- Kolde, R. (2019). pheatmap: Pretty Heatmaps. <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>
- Kuhn, M. (2008). Building Predictive Models in R Using the caret Package. *Journal of Statistical Software*, 28(5), 1-26.

- Langley, R., Krueger, G., Griffiths, C. (2005). Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 64:ii18–ii23.
- Larbi, A., Fulop, T. (2014). From “truly naïve” to “exhausted senescent” T cells: When markers predict functionality. *Cytometry A* 85:25–35.
- Lowes, M. A., Bowcock, A. M., Krueger, J. G. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445:866–873.
- Lu, Q. (2013). The critical importance of epigenetics in autoimmunity. *J Autoimmun* 41:1–5.
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol* 14(Suppl2):49.
- Martin, M. D., Badovinac, V. P. (2018). Defining Memory CD8 T Cell. *Front Immunol* 9:2692.
- Mikeska, T., Craig, J. M. (2014). DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. *Genes* 5:821–864.
- Murphy, M., Kerr, P., Grant-Kels, J. M. (2007). The histopathologic spectrum of psoriasis. *Clin Dermatol* 25:524–528.
- Myers, W. A., Gottlieb, A. B., Mease, P. (2006). Psoriasis and psoriatic arthritis: clinical features and disease mechanisms. *Clin Dermatol* 24:438–447.
- Nair, R. P., Stuart, P., Henseler, T., et al. (2000). Localization of psoriasis-susceptibility locus PSORS1 to a 60-kb interval telomeric to HLA-C. *Am J Hum Genet* 66:1833–1844.
- Nasu, K., Kawano, Y., Tsukamoto, Y., et al. (2011). Aberrant DNA methylation status of endometriosis: Epigenetics as the pathogenesis, biomarker and therapeutic target: Aberrant DNA methylation in endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res* 37:683–695.
- Park, B. S., Youn, J. I. (1998). Factors Influencing Psoriasis: An Analysis Based upon the Extent of Involvement and Clinical Type. *J Dermatol* 25:97–102.
- Pereira, B. I., Akbar, A. N. (2016). Convergence of Innate and Adaptive Immunity during Human Aging. *Front Immunol* 7:445.
- Potter, K. A., Motaparthy, K., Schoch, J. J. (2017). Erythrodermic psoriasis after discontinuation of ixekizumab. *JAAD Case Rep* 4:22–23.

- Prinz, J. C. (2003). The role of T cells in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 17:257–270.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rakyan, V. K., Down, T.A., Balding, D. J., Beck, S. (2011). Epigenome-Wide Association Studies for common human diseases. *Nat Rev Genet* 12:529–541.
- Raychaudhuri, S. K., Maverakis, E., Raychaudhuri, S. P. (2014). Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmun Rev* 13:490–495.
- Raychaudhuri, S. P., Farber, E. M. (2001). The prevalence of psoriasis in the world. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 15:16–17.
- Raychaudhuri, S. P., Gross, J. (2000). A Comparative Study of Pediatric Onset Psoriasis with Adult Onset. *Pediatr Dermatol* 17.
- Rodriguez, R. M., Suarez-Alvarez, B., Lavín, J. L., Mosén-Ansorena, D., Raneros, A. B., Márquez-Kisinousky, L., Aransay, A. M., Lopez-Larrea, C. (2017). Epigenetic Networks Regulate the Transcriptional Program in Memory and Terminally Differentiated CD8+ T Cells. *J Immunol* 198:937–949.
- Šahmatova, L., Sügis, E., Šunina, M., et al. (2017). Signs of innate immune activation and premature immunosenescence in psoriasis patients. *Sci Rep* 7:7553.
- Sallusto, F., Lenig, D., Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *401:708-12*.
- Salomon, J., Szepietowski, J. C., Proniewicz, A. (2003). Psoriatic Nails: A Prospective Clinical Study. *J Cutan Med Surg* 7:317–321.
- Sampogna, F., Gisondi, P., Melchi, C. F., et al. (2004). Prevalence of symptoms experienced by patients with different clinical types of psoriasis. *Br J Dermatol* 151:594–599.
- Schön, M. P., Boehncke, W. H. (2005). Psoriasis. *N Engl J Med* 352:1899-912.
- Slowikowski, K. (2018). ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with ggplot2. <https://CRAN.R-project.org/package=ggrepel>.
- Smith, C. H., Barker, J. N. (2006). Psoriasis and its management. *BMJ* 333:380–384.

- Szepietowski, J. C., Salomon, J. (2007). Do fungi play a role in psoriatic nails? *Mycoses* 50:437–442.
- Tserel, L., Kolde, R., Limbach, M., et al. (2015). Age-related profiling of DNA methylation in CD8⁺ T cells reveals changes in immune response and transcriptional regulator genes. *Sci Rep* 5:13107.
- Valdimarsson, H., Thorleifsdottir, R. H., Sigurdardottir, S. L., et al. (2009). Psoriasis – as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol* 30:494–501.
- Veale, D. J. (2005). Immunopathology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 64:ii26–ii29.
- Verma, K., Ogonek, J., Varanasi, P. R., et al. (2017). Human CD8⁺ CD57⁺ TEMRA cells: Too young to be called “old.” *PLOS ONE* 12:e0177405.
- Villanova, F., Di Meglio, P., Nestle, F. O. (2013). Biomarkers in psoriasis and psoriatic arthritis *Ann Rheum Dis* 72:ii104-ii110.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.
- Wickham, H. (2018). *scales: Scale Functions for Visualization*. <https://CRAN.R-project.org/package=scales>.
- Wickham, H. (2019). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
- Wrone-Smith, T., Mitra, R. S., Thompson, C. B., et al. (1997). Keratinocytes derived from psoriatic plaques are resistant to apoptosis compared with normal skin. *Am J Pathol* 151:1321–1329.
- Youngblood, B., Hale, J. S., Kissick, H. T., et al. (2017). Effector CD8 T cells dedifferentiate into long-lived memory cells. *Nature* 552:404–409.
- Zilberman, D., Henikoff, S. (2007). Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development* 134:3959–3965.
- Heinaru, A. (2012). *Geneetika: õpik kõrgkoolidele*. p. 482-486, 716-722. Tartu Ülikooli Kirjastus, Eesti.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. Kasutatud 23.05.19 <http://www.epsol.ee/print.php?doc=40&print=true>
2. Kasutatud 23.05.19 <https://beckyb.com.au/2018/10/psoriasis-i-think-ive-got-it-but-im-not-sure/>
3. Kasutatud 23.05.19 http://missinglink.ucsf.edu/lm/genes_and_genomes/methylation.html

LISAD

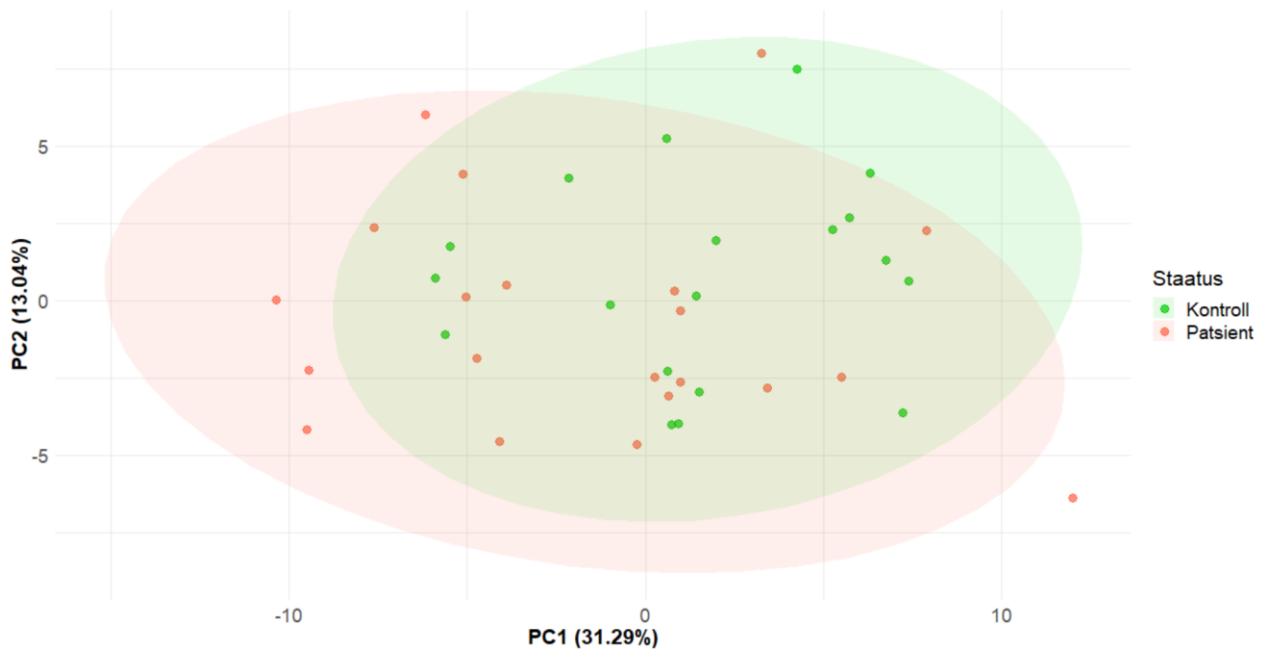
Lisa 1. Töös CpG lookused, kasutatud praimerid ja ampikonide pikkused

Nr	Asukoht kromosoomis	Geen	CpG lookus		Praimerite järjestused (5' → 3')	Pikkus (nt)
1	chr1.167426278	CD247	cg18858739	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGTAGTGAGGATAGTTTTGGA	170
				R	ACCACCCACAACACTACAAACAGACAGAGAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
2	chr1.240164756	-	cg02051545	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTTGATTTAGATATTAAGTGGTTGT	188
				R	CCTCTATAATCACAAAATTCTATAACGACAGAGAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
3	chr1.9339683	-	cg20700740	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATTAAGTTTTAAAATGTAGTGTAGA	222
				R	AAACTCCAATACATCTCCAATTGACAGAGAAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
4	chr2.87012810	CD8A	cg00219921	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGATGGTATGGGTGTTTTAG	188
				R	ATATTATCATAACACTAAAAACCCGACAGAGAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
5	chr2.87020937	CD8A	cg25939861	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGTGATGATGGTTAGATTTGGGG	193
				R	TCACAATCAATCACCCACACAGACAGAGAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
6	chr3.114012834	TIGIT	cg13669740	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATGTAGTTTGTGTATTGTGTAT	217
				R	TCACCATCTTCTCCAATATAAACGACAGAGAAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
7	chr3.196065318	M4SF19	cg22496559	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGTTTTAGGGTTGGATTTGAA	207
				R	CAAATATCCAAACATAACTTCCGACAGAGAAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
8	chr3.38992201	SCN11A	cg02244028	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTTTGGAGGATTTGGTAAAAGG	200
				R	CCAACTTAACAACCTTACCCTGACAGAGAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
9	chr7.553423	PDGFA	cg20063728	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGTTTAGGATTAGTAGTTTAAAGT	228
				R	TTAAAATATCTTCCACAATCCATTTTCGACAGAGAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
10	chr11.118213330	CD3D	cg24841244	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAGGGTAGTTAGTATTAGGTTAG	177
				R	AATAATCAAACCCACTCTCAACGACAGAGAAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	

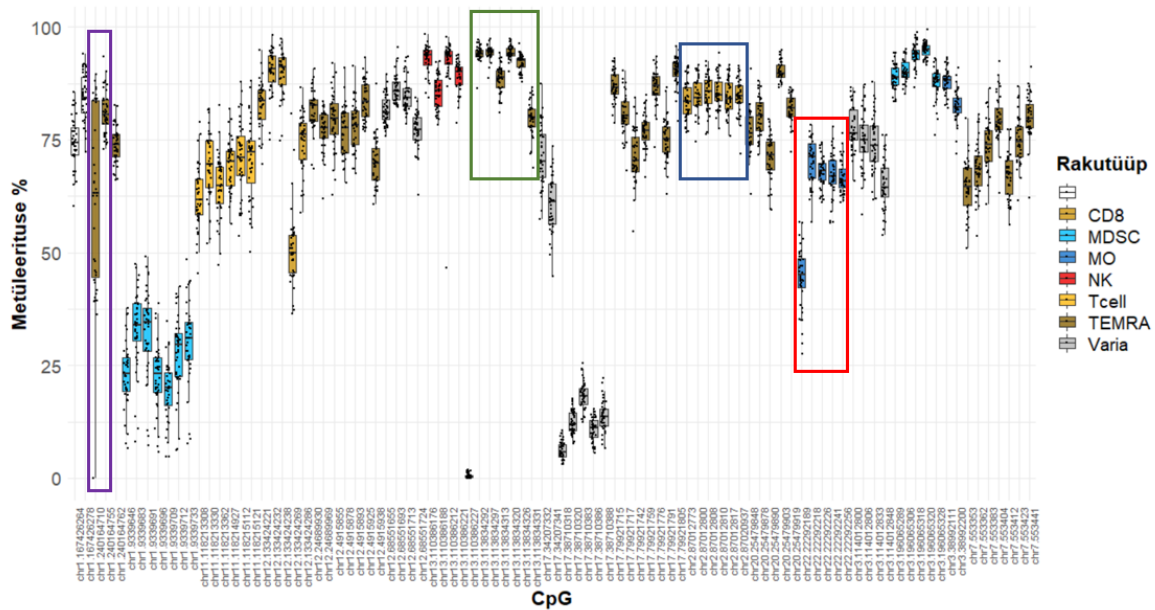
11	chr11.118214927	CD3G	cg07545925	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGGAGTTTTTGAGTGGGAATTTAGTA	205
				R	TATAAACATCATCTCCACCTGACAGAGAAT ATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
12	chr11.118215113	CD3G	cg15880738	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGGGTTGGTTGGTTGGTTGGTTGT	157
				R	TCCCTTCCCAAACCAACAAGACAGAGAATA TGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
13	chr12.133424222	CHFR	cg21232015	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGAGGTGTGTTTGTGGTAAGTT	217
				R	ACCCTTCCATTTACCAATCTTCTCGACAGAGA ATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
14	chr12.24689931	SOX5	cg06147361	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGGTAGAAGAGATAGTTATTATGTTA	216
				R	CTATACTAACTTAAATATAAAAACCTCGACA GAGAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
15	chr12.68551656	IFNG	cg01940810	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGGTTTATTTTTTGGAGAATAAATGTTTTG	212
				R	CAACAATAACTTTTTAACTATAAATACGAC AGAGAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
16	chr13.110386177	-	cg24430034	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGTGGTAGTATTTGGGGAG	189
				R	TCCAATACCAATCCTCTAAAAGACAGAGAAT ATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
17	chr13.113834332	PCID2	cg06567722	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGAAGAGTTTTTGTAGGTGAT	182
				R	ACATCATCATCATCCAACAAAAGACAGAGAA TATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
18	chr17.34207332	CCL5	cg10315334	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGTGGTATTTGTGGGAGAGGTTGT	173
				R	TCCAATCAACTCCCCATAAGACAGAGAATA TGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
19	chr17.38710321	CCR7	cg23663547	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGTGGAGTTTAGAGTGTGGTTTTGA	187
				R	TTCACTCCCCTACTCACACAGACAGAGAATA TGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
20	chr17.79921716	-	cg04467549	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGGGGTGATAATAGTGTTTTGTAGA	243
				R	TACCTCAAACATACAACCTTAGACAGAGAATA TGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
21	chr20.25479848	NINL	cg13486641	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGGAGGAGTAATGGTATTTTGGGA	200
				R	AATATCATCAAACTCCAATCTTACGACAGA GAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
22	chr22.22292241	PPMIF	cg25898577	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGGTTGAGGTAGTGTGTTTAGTTTA	188

				R	TCCCCAACTAACCATCAATATATCTGACAGA GAATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	
23	chr12.4915855	-	cg26215982	F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGAGTTTTGTTGAAGGGTGGT	209
				R	ACAAAACAATCCTAACCAAAACCTGACAGAGA ATATGTGTAGAGGCTCGGGTGCTCTG	

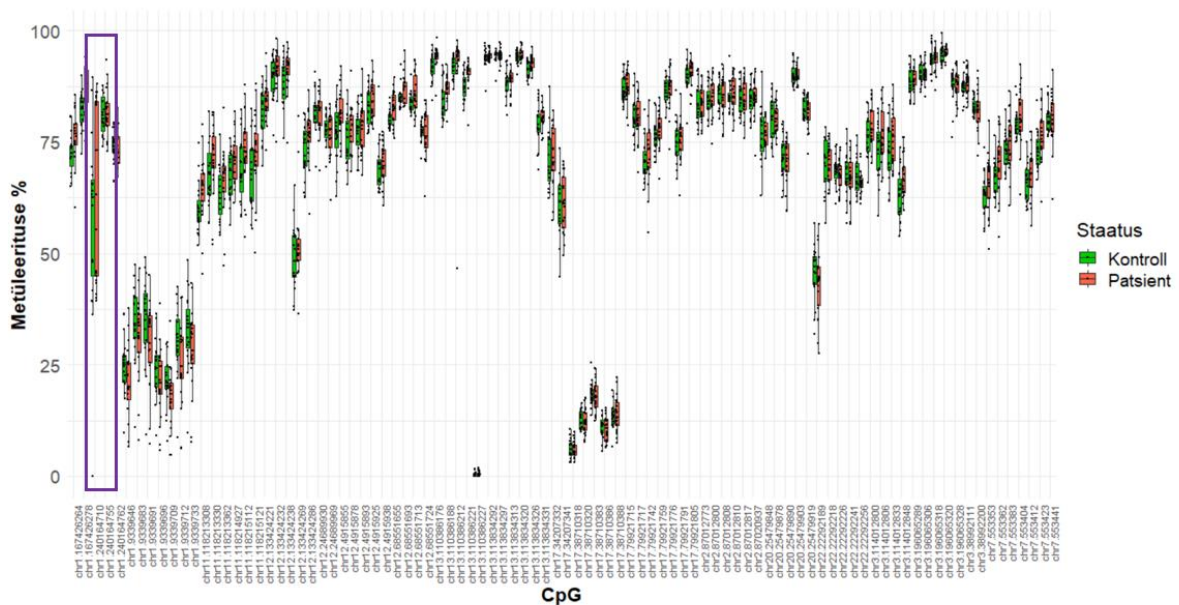
Lisa 2. 93 CpG lookuse metüleerituse varieeruvuse ulatus haigete patsientide ja tervete gruppides. Telgedel on põhikomponendid 1 (PC1) ja 2 (PC2). Kontrollide ja psoriaasahaigete grupp on eristatud värvikoodiga. Iga punkt tähistab joonisel ühte indiviidi.



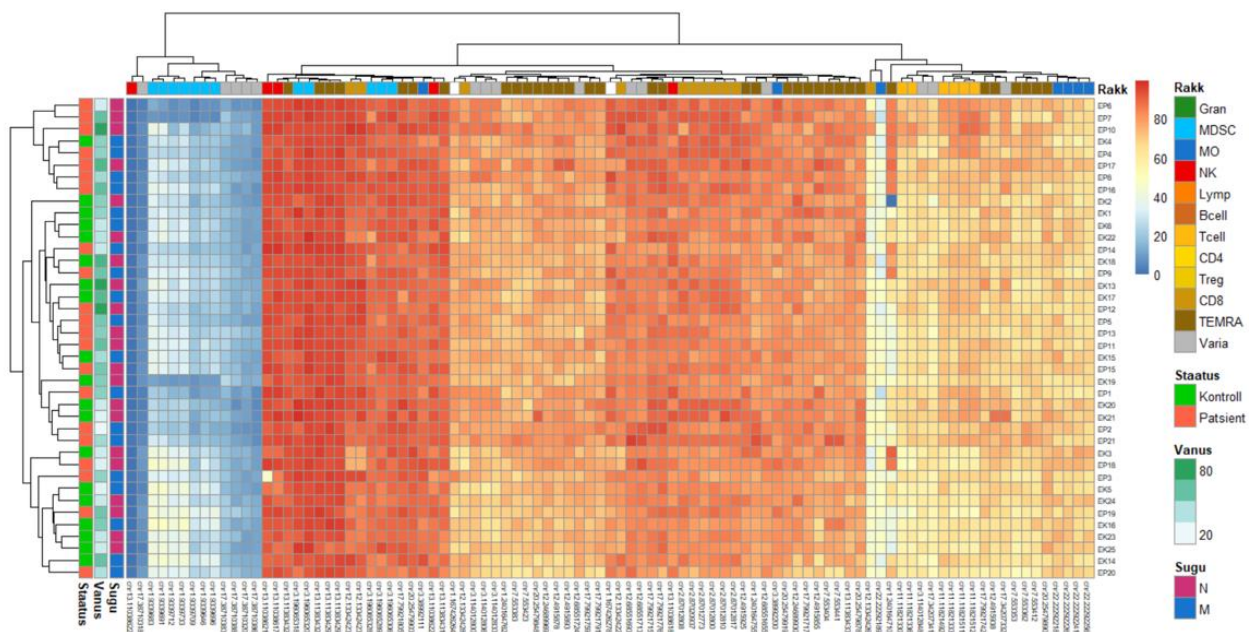
Lisa 3. 93 CpG lookuse metüleerituse protsent 40-l indiviidil. X-teljel on välja toodud 93 CpG lookuse asukohad kromosoomis ning y-teljel metüleerituse protsent. Lookuste metüleerituse taseme hajuvus on näidatud karpdiagrammina (*boxplot*). Värvikoodiga on eristatud erinevad rakutüübid. Rohelise kastiga on ümbritsetud kõige väiksema metüleerituse hajuvusega ühte ampliconi kuuluvad CpG lookused, mis asuvad 13. ampliconis. Tumesinise kastiga on ümbritsetud kõige kõige ühtlasema metüleerituse tasemega CpG lookused, mis asuvad CD8A geenis 4. ampliconis. Punase kastiga on ümbritsetud 22. ampliconi PPMIF geenis paiknevad CpG lookused, mille metüleerituse taseme hajuvused on varieeruvamad, kuigi asuvad lähestikku samas ampliconis.



Lisa 4. 93 CpG lookuse metülatsooni taseme võrdlus kontrollide ja psoriaasihagete inimeste seas lookuste kaupa. X-teljel on välja toodud 93 CpG lookuse asukohad kromosoomis ning y-teljel metüleerituse protsent. Grupid on eristatud värvikoodiga. Karpdiagrammid väljendavad lookuse metüleerituse tasemete hajuvust gruppide lõikes. Lilla kastiga on tähistatud kõige suurema metüleerituse hajuvusega 2. amplikoni (asub 2. kromosoomis) geenide vahelisesse alasse kuuluvad CpG lookused.



Lisa 5. 93 CpG lookuse metüleerituse profiil 40-l indiviidil. Reas on välja toodud individid, nende vanus, sugu ja gruppi kuuluvus (kontroll/patsient). Tulbas on CpG lookuste asukoht kromosoomis. Iga kast näitab ühe lookuse metüleerituse taset ühel indiviidil. Värvikoodiga on eristatud erinevad rakutüübid, gruppi kuuluvus, vanus, sugu ja metüleerituse tase.



LIHTLITSENTS

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Anella Salmistu

(sünnikuupäev: 6. mai 1997)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „CD8⁺ TEMRA rakkude hindamine psoriaasi korral“, mille juhendajad on Liina Tserel, Ahto Salumets ja Lili Azin Milani, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Anella Salmistu

27.05.2019